

IMPLANTABLE BIOCOMPATIBLE IMMUNOISOLATORY VEHICLE FOR DELIVERY OF SELECTED THERAPEUTIC PRODUCTS

Publication number: JP6507412 (T)

Publication date: 1994-08-25

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:






- international: A61F2/02; A61K35/12; A61K35/30; A61K35/39; A61K38/18; A61K39/395; A61K47/36; A61K48/00; A61K9/00; A61K9/50; A61L27/00; C12N5/00; C12N5/06; A61F2/02; A61K35/12; A61K35/30; A61K35/37; A61K38/18; A61K39/395; A61K47/36; A61K48/00; A61K9/00; A61K9/50; A61L27/00; C12N5/00; C12N5/06; (IPC1-7): A61F2/02; A61K35/12; A61K39/395; A61K47/36; A61L27/00

- European: A61K35/12; A61K35/30; A61K35/39; A61K38/18F; A61K48/00; A61K9/00M5D; A61K9/00Z4; C12N5/00R; C12N5/06B16; C12N5/06B22A; C12N5/06B7A

Application number: JP19920511898T 19920422

Priority number(s): WO1992US03327 19920422; US19910692403 19910425

Also published as:

 JP4215273 (B2)
 WO9219195 (A1)
 US5800828 (A)
 SG47470 (A1)
 NO933842 (A)

more >>

Abstract not available for JP 6507412 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9219195 (A1)**

An immunoisulatory vehicle for the implantation into an individual of cells which produce a needed product or provide a needed metabolic function. The vehicle is comprised of a core region containing isolated cells and materials sufficient to maintain the cells, and a permselective, biocompatible, peripheral region free of the isolated cells, which immunoisolates the core yet provides for the delivery of the secreted product or metabolic function to the individual. The vehicle is particularly well-suited to delivery of insulin from immunoisolated islets of Langerhans, and can also be used advantageously for delivery of high molecular weight products, such as products larger than IgG. A method of making a biocompatible, immunoisulatory implantable vehicle, consisting in a first embodiment of a coextrusion process, and in a second embodiment of a stepwise process. A method for isolating cells within a biocompatible, immunoisulatory implantable vehicle, which protects the isolated cells from attack by the immune system of an individual in whom the vehicle is implanted. A method of providing a needed biological product or metabolic function to an individual, comprising implanting into the individual an immunoisulatory vehicle containing isolated cells which produce the product or provide the metabolic function.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-507412

第3部門第2区分

(43)公表日 平成6年(1994)8月25日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 35/12		7431-4C	
A 6 1 F 2/02		9361-4C	
A 6 1 K 39/395	A	9284-4C	
47/36	B	7433-4C	
A 6 1 L 27/00	Z	7167-4C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21)出願番号 特願平4-511898
 (86)(22)出願日 平成4年(1992)4月22日
 (85)翻訳文提出日 平成5年(1993)10月25日
 (86)国際出願番号 PCT/US92/03327
 (87)国際公開番号 WO92/19195
 (87)国際公開日 平成4年(1992)11月12日
 (31)優先権主張番号 692, 403
 (32)優先日 1991年4月25日
 (33)優先権主張国 米国 (US)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, FI, JP, KR, NO, US

(71)出願人 ブラウン ユニヴァーシティ リサーチ
 ファンデーション
 アメリカ合衆国 ロードアイランド州
 02912 プロヴィデンス チャールズフィ
 ールド ストリート 42 ブラウン ユニ
 ヴァーシティ サード フロアー グラデ
 ユエイト センター ボックス 1949
 (72)発明者 ディオン キース イー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州
 02769 リホバス フェアフィールド ス
 トリート 35
 (74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 選択された治療物質放出用の移植可能で生体適合性の免疫遮断性ビークル

(57)【要約】

必要とされる生成物を産生し、もしくは必要な代謝機能を与える細胞を個体内に移植するための免疫遮断性ビークル。このビークルは隔離された細胞と該細胞を維持するのに十分な物質を含むコア領域と、該コアを免疫遮断し、かつ該個体に該分泌された生成物を放出しもしくは該代謝機能を該個体に付与する、該隔離細胞を含まない選択透過性で生体適合性の周辺領域とを含む。このビークルは、特に免疫遮断されたランゲルハンスの島細胞からインシュリンを放出するのに適しており、かつまた高分子量生成物、例えばIgG よりも大きな生成物を放出するために有利に使用できる。生体適合性で免疫遮断性の移植可能性のビークルの製造法は第一の態様では同時押し出し法からなり、また第二の態様では2段階法からなる。細胞を生体適合性で免疫遮断性の移植可能性のビークル内に隔離する方法は、該ビークルを移植する個体の免疫系による攻撃から該隔離された細胞を防禦する。必要な生物学的生成物または代謝機能を個体に与える方法は、該生成物を産生しまたは該代謝機能を付与する隔離細胞を含む免疫遮断性ビークルを該個体に移植する工程

を含む。

請求の範囲

1. 生物学的に活性な生成物または機能を個体を与えるための移植可能な免疫遮断性のビークルであって、

(a) ヒドロゲル製の生体適合性マトリックス中に分散された生きた細胞を含むコアと、

(b) 該コアから外部に突出した上記細胞を含まない生体適合性ヒドロゲル材料製の、該コアを包囲する外部拡散性の表面をもつジャケットとを含み、

上記細胞は選択された生物学的に活性な生成物を分泌することができるか、あるいは選択された生物学的な機能を個体と与えることができ、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下の分子量遮断値を有し、かつ該ジャケットを介して該個体とコアとの間で該生物学的な生成物または機能を与えるのに必要とされる物質の透過を可能とし、該コアと外部ジャケットとが実質的に直接的なイオン結合をもたずかつ中間的な結合層をもたない界面を形成することを特徴とする上記免疫遮断性ビークル。

2. 該コアおよびジャケットが同一の型のヒドロゲルから作成される請求の範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

3. 該ヒドロゲルが多価イオンにより架橋されたアルギン酸塩を含む請求の範囲第2項に記載の免疫遮断性ビークル。

4. 1 μ l を越えるコア体積をもつ請求の範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

5. 該ビークルが移植後に回収するのに十分なサイズおよび耐久性をもつものである請求の範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

6. 該細胞がインシュリン産生細胞、副腎クロム親和性細胞、抗体分泌細胞、歯槽芽細胞、神経芽細胞、 β 細胞系およびチャイニーズハムスターの卵巣細胞からなる群から選ばれるものである請求の範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

7. 該細胞が細胞銀行由来のものである請求の範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

8. 該細胞全体が拡散性表面から約800 μ m 未満の距離で配置されている請求の

断性ビークル。

17. 該コアとジャケットとの間の該界面が、該コアとジャケットとを結合する組織形成誘導性の物質の中間層を含まない請求の範囲第12項に記載の免疫遮断性ビークル。

18. 該細胞全体が拡散性表面から約800 μ m 未満の距離で配置されている請求の範囲第12項に記載の免疫遮断性ビークル。

19. 該コアと該外部ジャケットとが直接的イオン結合を実質的に含まない界面を形成する請求の範囲第12項に記載の免疫遮断性ビークル。

20. 該外部ジャケットが非一坪状の形状にある請求の範囲第12項に記載の免疫遮断性ビークル。

21. 生物学的に活性な生成物または機能を個体と与えるための移植可能な免疫遮断性のビークルであって、

(a) 生体適合性の細胞外マトリックス中に分散された少なくとも約100 個の細胞クラスターを含むコアと、

(b) 生体適合性材料で作られた、該コアを包囲する外部拡散性の表面をもつジャケットとを含み、

上記細胞クラスターは生物学的に活性な生成物を分泌することができるか、あるいは生物学的な機能を個体と与えることができ、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下の分子量遮断値を有し、かつ該ジャケットを介して該個体とコアとの間で該生物学的な生成物または機能を与えるのに必要とされる物質の透過を可能とすることを特徴とする上記免疫遮断性ビークル。

22. 該コア生体適合性マトリックスがヒドロゲルから作られている請求の範囲第21項に記載の免疫遮断性ビークル。

23. 該分子量遮断値が約100 kD以上である請求の範囲第21項に記載の免疫遮断性ビークル。

24. 該細胞が天然菌の個々の細胞または細胞クラスターを、単位増殖当たりの高い充填密度を得るのに適した改良された拡散性母体形状に培養させることにより生成される請求の範囲第21項に記載の免疫遮断性ビークル。

範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

9. 該ジャケットが約5~200 μ の範囲内の厚みを有する請求の範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

10. 該コアとジャケットとの間の該界面が、該コアとジャケットとを結合する組織形成誘導性の物質の中間層を含まない請求の範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

11. 該コアが少なくとも約10⁴ 個の細胞を含む請求の範囲第1項に記載の免疫遮断性ビークル。

12. 生物学的に活性な生成物または機能を個体と与えるための免疫遮断性のビークルであって、

(a) 生体適合性のヒドロゲルマトリックス中に分散された生きた細胞を含むコアと、

(b) 生体適合性材料で作られた、該コアを包囲する外部拡散性の表面をもつジャケットとを含み、

上記細胞は生物学的に活性な生成物を分泌することができるか、あるいは生物学的な機能を個体と与えることができ、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下の分子量遮断値を有し、かつ該ジャケットを介して該個体とコアとの間で該生物学的な生成物または機能を与えるのに必要とされる物質の透過を可能とし、該コアが少なくとも約10⁴ 個の細胞を含むことを特徴とする上記免疫遮断性ビークル。

13. 該コア生体適合性マトリックスがアルギン酸塩から作られている請求の範囲第12項に記載の免疫遮断性ビークル。

14. 該細胞がインシュリン産生細胞、副腎クロム親和性細胞、抗体分泌細胞、歯槽芽細胞、神経芽細胞、 β 細胞系およびチャイニーズハムスターの卵巣細胞からなる群から選ばれるものである請求の範囲第12項に記載の免疫遮断性ビークル。

15. 該ジャケットがヒドロゲル材料製である請求の範囲第12項に記載の免疫遮断性ビークル。

16. 該ジャケットが熱可塑性ポリマー製である請求の範囲第12項に記載の免疫遮

断性ビークル。

25. 該細胞クラスターが胰岛細胞、副腎クロム親和性細胞、およびインシュリン分泌細胞系からなる群から選ばれる請求の範囲第21項に記載の免疫遮断性ビークル。

26. 該ジャケットがヒドロゲル材料で作成されている請求の範囲第21項に記載の免疫遮断性ビークル。

27. 生物学的に活性な生成物を個体と与えるための移植可能かつ回収可能な免疫遮断性のビークルであって、

(a) 成長因子、栄養因子またはこれら両者からなる群から選ばれる生物学的に活性な生成物を分泌することのできる細胞を含むコアと、

(b) 外方向に突出した該細胞を含まない生体適合性材料で作られた周辺外部ジャケットとを含み、

上記細胞は生体適合性材料中に分散されており、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下の分子量遮断値を有することを特徴とする上記免疫遮断性ビークル。

28. 該細胞が神経成長因子を分泌する請求の範囲第27項に記載の移植可能なビークル。

29. 生物学的に活性な生成物を個体と与えるための移植可能かつ回収可能な免疫遮断性のビークルであって、

(a) 細胞移行からの細胞を含むコアと、

(b) 外方向に突出した該細胞を含まない生体適合性材料で作られた周辺外部ジャケットとを含み、

上記細胞は生物学的に活性な生成物を分泌でき、かつ該細胞は生体適合性材料中に分散されており、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下の分子量遮断値を有し、かつ該生物学的に活性な生成物の分子量よりも高い分子量遮断値をもつことを特徴とする上記免疫遮断性ビークル。

30. 生物学的に活性な生成物または機能を個体と与えるための移植可能な免疫遮断性のビークルであって、

(a) ヒドロゲル製の生体適合性のマトリックス中に分散された生きた細胞を

むコアと、

(b) 生体適合性ヒドロゲル材料製の、該コアを包囲する外部拡散性の表面をもつジャケットとを含み、

上記細胞は選択された生物学的に活性な生成物を分泌することができるか、あるいは選択された生物学的な機能を個体と与えることができ、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下の分子量断片を有し、かつ該ジャケットを介して該個体とコアとの間で該生物学的な生成物または機能を与えるのに必要とされる物質の通過を可能とすることを特徴とする上記免疫遮断性ビークル。

31. 該ビークルが平坦なシートである請求の範囲第30項に記載の免疫遮断性ビークル。

32. 該外部ジャケットが實質的に平坦またはチューブ状の形状にある請求の範囲第30項に記載の免疫遮断性ビークル。

33. 該ジャケットがヒドロゲル製である請求の範囲第30項に記載の免疫遮断性ビークル。

34. 生物学的に活性な生成物を分泌することができるか、あるいは生物学的な機能を個体と与えることができ、生体適合性のヒドロゲルマトリックス中に分散された生きた細胞を含むコアと、該細胞を含まない生体適合性かつ選択透過性の、該コアを包囲する外部ジャケットとを含む免疫遮断性ビークルの製造方法であって、

(a) 該細胞を分散するのに十分な生体適合性のヒドロゲルマトリックス先駆体中に懸濁された該細胞の懸濁液と、

(b) 生体適合性のジャケット壁-形成性の先駆体材料の溶液とを、

巣状の二重孔押しノズルから同時に押し出す工程を含み、該溶液(b)から生体適合性のマトリックスまたは膜を形成するのに適した条件下で、該懸濁液(a)を該ノズルの内孔から同時押し出し、かつ該溶液(b)をその外孔から同時押し出すことを特徴とする上記方法。

35. 該細胞懸濁液(a)および該溶液(b)を、該ヒドロゲルマトリックス先駆体からヒドロゲルマトリックスを形成するのに十分な条件下で同時押し出す請求の

範囲第34項に記載の方法。

43. 該ジャケットの生体適合性材料がヒドロゲル材料で作られており、かつ該ジャケットが押し出しにより形成される請求の範囲第42項に記載の方法。

44. 該ジャケットのヒドロゲル材料および生体適合性ヒドロゲル媒体がアルギン酸塩を含む請求の範囲第43項に記載の方法。

45. 該ジャケットが熱可塑性プラスチック材料で作られている請求の範囲第43項に記載の方法。

46. 患者が必要とする選択された生物学的に活性な生成物を該患者に与える方法であって、該患者の体内に上記請求の範囲第1、2、4、7、10、12、16、17、25および27項に記載の型の免疫遮断性ビークルを移植する工程を含み、該細胞が該生物学的に活性な生成物を分泌し、該生物学的に活性な生成物が該免疫遮断性ビークルから該患者の体内に分泌されることを特徴とする上記方法。

47. 患者が必要とする選択された代謝機能を該患者に与える方法であって、該患者の体内に上記請求の範囲第1、2、4、7、10、12、16、17、25および27項に記載の型の免疫遮断性ビークルを移植する工程を含み、該細胞が該代謝機能を発揮し、該代謝機能が該免疫遮断性ビークル内の該細胞によって該患者に与えられることを特徴とする上記方法。

48. 患者が必要とする選択された生物学的に活性な機能を該患者に与える方法であって、該患者の体内に該生物学的に活性な生成物を個体と与える移植可能かつ回収可能な免疫遮断性ビークルを移植する工程を含み、該免疫遮断性ビークルが

(a) 該生物学的に活性な生成物を分泌できかつ生体適合性材料中に分散されたコアと、

(b) 外方向に突出した該細胞を含まない生体適合性材料で作られた周辺外部ジャケットとを含み、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下であって、かつ該生物学的に活性な生成物の分子量よりも高い分子量断片を有し、かつ該ジャケットが移植前に血液に暴露されないことを特徴とする上記方法。

範囲第34項に記載の方法。

36. 該生体適合性ヒドロゲルマトリックス(a)がアルカリ金属アルギン酸塩を含み、該ヒドロゲルマトリックス(a)を該溶液(b)と共に、多価カチオン水溶液中に同時押し出す請求の範囲第34項に記載の方法。

37. 該溶液(b)がヒドロゲルマトリックス先駆体を含み、かつ該細胞懸濁液(a)および該溶液(b)を該先駆体からヒドロゲルマトリックスを形成する条件下で同時押し出す請求の範囲第34項に記載の方法。

38. 該溶液(b)がアルカリ金属アルギン酸塩を含み、かつ該細胞懸濁液(a)および該溶液(b)を水性塩化カルシウム溶液中に同時押し出す請求の範囲第34項に記載の方法。

39. 該溶液(b)が水-混和性溶液中に溶解した水-不溶性熱可塑性ポリマーまたはコポリマーを含み、かつ該細胞懸濁液(a)および該溶液(b)を水性媒体中に同時押し出す請求の範囲第34項に記載の方法。

40. 移植可能かつ回収可能な免疫遮断性ビークルの製造法であって、該方法が以下の諸工程:

(a) 生物学的に活性な生成物を分泌することのできる複数の細胞を生体適合性ヒドロゲル媒体中に含むコアを形成する工程と、

(b) 該コアの回りに、該ヒドロゲル媒体と直接接触した状態で、外部拡散可能な表面をもつヒドロゲル材料製のジャケットを形成する工程とを含み、該ジャケットヒドロゲルが該細胞が外方向に突出するのを防止するのに十分な厚みを有するものであることを特徴とする上記方法。

41. 該ジャケットが、該ジャケットヒドロゲルと該コアヒドロゲルとの架橋により形成される請求の範囲第40項に記載の方法。

42. 移植可能かつ回収可能な免疫遮断性ビークルの製造法であって、該方法が以下の諸工程:

(a) 生体適合性材料のジャケットを形成する工程と、

(b) 該ジャケットに、生物学的に活性な生成物を分泌することのできる複数の細胞を含むコアを充填する工程とを含み、

分散された該細胞を實質的に固定化するのに十分な粘度をもつ生体適合性のヒ

ドロゲル媒体中に分散されており、該ジャケットが該細胞の免疫学的な拒絶反応

によって本質的な物質の分子量以下であって、かつ該生物学的に活性な生成物の分子量よりも高い分子量断片を有していることを特徴とする上記方法。

43. 該ジャケットの生体適合性材料がヒドロゲル材料で作られており、かつ該ジャケットが押し出しにより形成される請求の範囲第42項に記載の方法。

44. 該ジャケットのヒドロゲル材料および生体適合性ヒドロゲル媒体がアルギン酸塩を含む請求の範囲第43項に記載の方法。

45. 該ジャケットが熱可塑性プラスチック材料で作られている請求の範囲第43項に記載の方法。

46. 患者が必要とする選択された生物学的に活性な生成物を該患者に与える方法であって、該患者の体内に上記請求の範囲第1、2、4、7、10、12、16、17、25および27項に記載の型の免疫遮断性ビークルを移植する工程を含み、該細胞が該生物学的に活性な生成物を分泌し、該生物学的に活性な生成物が該免疫遮断性ビークルから該患者の体内に分泌されることを特徴とする上記方法。

47. 患者が必要とする選択された代謝機能を該患者に与える方法であって、該患者の体内に上記請求の範囲第1、2、4、7、10、12、16、17、25および27項に記載の型の免疫遮断性ビークルを移植する工程を含み、該細胞が該代謝機能を発揮し、該代謝機能が該免疫遮断性ビークル内の該細胞によって該患者に与えられることを特徴とする上記方法。

48. 患者が必要とする選択された生物学的に活性な機能を該患者に与える方法であって、該患者の体内に該生物学的に活性な生成物を個体と与える移植可能かつ回収可能な免疫遮断性ビークルを移植する工程を含み、該免疫遮断性ビークルが

(a) 該生物学的に活性な生成物を分泌できかつ生体適合性材料中に分散されたコアと、

(b) 外方向に突出した該細胞を含まない生体適合性材料で作られた周辺外部ジャケットとを含み、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下であって、かつ該生物学的に活性な生成物の分子量よりも高い分子量断片を有し、かつ該ジャケットが移植前に血液に暴露されないことを特徴とする上記方法。

49. 患者における神経の衰質を治療する方法であって、該患者に

(a) 成長因子、栄養因子またはこれら両者を分泌し、生体適合性マトリックス中に分散された生きた細胞を含むコアと、

(b) 外方向に突出した該細胞を含まない生体適合性材料で作られた周辺外部ジャケットとを含み、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下であって、かつ該細胞により分泌される物質の分子量よりも高い分子量断片を有し、該分泌された因子が該免疫遮断性ビークルから該患者の体内に放出されることにより該神経の衰質状態を治療することを特徴とする上記方法。

請求の範囲第58項記載の方法。

60. 該グリコサミノグリカン類がヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリンおよびヘパリン硫酸からなる群から選ばれる請求の範囲第59項記載の方法。

61. 患者における神経の衰質の進行を阻止する方法であって、該患者に

(a) 成長因子、栄養因子またはこれら両者を分給し、生体適合性マトリックス中に分散された生きた細胞を含むコアと、

(b) 外方向に突出した該細胞を含まない生体適合性材料で作られた周辺外部ジャケットとを含み、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下であって、かつ該細胞により分泌される物質の分子量よりも高い分子量遮断値を有し、該分泌された因子が該免疫遮断性ビークルから該患者の体内に放出されることにより該神経の衰質状態を治療することとを特徴とする上記方法。

62. 該神経衰質がパーキンソン病に関連する請求の範囲第61項記載の方法。

63. 該神経衰質が神経毒性促進性により生ずる請求の範囲第61項記載の方法。

64. 該神経毒性促進性がグルタミン酸またはグルタミン酸類似体により発生する請求の範囲第61項に記載の方法。

65. 該神経衰質状態がハンチントン舞踏病またはAIDS-関連痴呆である請求の範囲第61項に記載の方法。

66. 該神経衰質状態がコリン作用性のニューロン衰質である請求の範囲第61項に記載の方法。

67. 該神経衰質状態がアルツハイマー病である請求の範囲第61項記載の方法。

68. 該細胞が組み換え神経成長因子を分泌するように遺伝子操作された細胞を含む請求の範囲第61項記載の方法。

69. 該細胞が副腎クロム親和性細胞、シュワン細胞、グリア細胞または神経膠星状細胞からなる群から選ばれる請求の範囲第61項記載の方法。

70. 該因子が神経成長因子、基本的繊維芽細胞成長因子、シリア線毛神経栄養因子、脳一由来の神経栄養因子、ニューロトロフィン3、およびニューロプロテクチンからなる群から選ばれるものである請求の範囲第61項記載の方法。

71. 該生体適合性マトリックスが細胞外マトリックス成分である請求の範囲第61

(b) 外方向に突出した上記細胞を含まない生体適合性ヒドロゲル材料製の、該コアを包囲する外部ジャケットとを含み、

上記細胞は選択された生物学的に活性な生成物を分泌することができるか、あるいは選択された生物学的な機能を個体に与えることができ、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下の分子量遮断値を有し、かつ該ジャケットを介して該個体とコアとの間で該生物学的な生成物または機能を与えるのに必要とされる物質の通過を可能とすることを特徴とする上記方法。

77. 該ビークルを皮下移植する請求の範囲第76項に記載の方法。

78. 該細胞がインシュリンを産生する請求の範囲第77項に記載の方法。

79. 該細胞が活発に分裂するβ細胞である請求の範囲第77項に記載の方法。

80. 該細胞がランゲルハンス島細胞を含む請求の範囲第77項に記載の方法。

81. 生物学的に活性な生成物または機能を個体に与えるための移植可能な免疫遮断性のビークルであって、

(a) 生体適合性マトリックス中に分散された生きた細胞を含むコアと、

(b) 外方向に突出した上記細胞を含まない生体適合性材料製の、該細胞を包囲する外部、非-球状ジャケットとを含み、

上記細胞は生物学的に活性な生成物を分泌することができるか、あるいは生物学的な機能を個体に与えることができ、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下であって、かつ100 kDを超える分子量遮断値を有することを特徴とする上記免疫遮断性ビークル。

82. 該細胞が該個体に対して同種である請求の範囲第81項に記載の免疫遮断性ビークル。

83. 該細胞が抗体を分泌するものである請求の範囲第81項に記載の免疫遮断性ビークル。

項記載の方法。

72. 該成分がコラーゲン、ラミニン、グリコサミノグリカン類、プロテオグリカン類、フィブロネクチン、エラスチンおよびその混合物からなる群から選ばれる請求の範囲第71項記載の方法。

73. 該グリコサミノグリカン類がヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリンおよびヘパリン硫酸からなる群から選ばれる請求の範囲第72項記載の方法。

74. 生物学的に活性な生成物を個体に与えるための移植可能な回収可能な免疫遮断性のビークルであって、

(a) 特定の病原体を含まない動物由来の細胞を含むコアと、

(b) 外方向に突出した上記細胞を含まない生体適合性材料製の周辺外部ジャケットとを含み、

上記細胞は生体適合性材料中に分散されており、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下であって、かつ該生物学的に活性な生成物の分子量よりも高い分子量遮断値を有することを特徴とする上記免疫遮断性ビークル。

75. 免疫遮断性のビークルを患者の皮下に移植することを含む患者における糖尿病の治療方法であって、該免疫遮断性ビークルが

(a) インシュリンを分泌する生きた細胞を含むコアと、

(b) 外方向に突出した上記細胞を含まない生体適合性材料製の周辺外部ジャケットとを含み、

上記細胞は生体適合性マトリックス中に分散されており、該ジャケットは該細胞の免疫学的な拒絶反応によって本質的な物質の分子量以下であって、かつ該細胞から分泌される物質の分子量よりも高い分子量遮断値を有し、該免疫遮断性ビークルから該患者に放出されるインシュリンにより糖尿病を治療することとを特徴とする上記糖尿病の治療方法。

76. 個体の体内に免疫遮断性ビークルを移植することを含む、該個体に生物学的に活性な生成物または機能を与える方法であって、該免疫遮断性ビークルが

(a) ヒドロゲル製の生体適合性のマトリックス中に分散された生きた細胞を含むコアと、

明 細 書

選択された治療物質放出用の移植可能で生体適合性の免疫遮断性ビークル

関連出願

本特許出願は、1991年4月25日付けで出願されたU.S.S.N. 07/692,403 の、35 USC 120に従う部分継続出願に係わる。

発明の背景

多くの臨床状態、欠乏症および疾患状態は、患者に生細胞により生成される因子を供給するか、あるいは該患者からその生細胞により代謝される有害な因子を除去することにより治療もしくは軽減することができる。多くの場合において、これらの因子は器官または組織の機能の悪化もしくは喪失を回復または補償することを可能とする。病因が分泌器官または組織の機能の喪失を含む疾患または欠乏症状態の例は、(a) ランゲルハンスの膵島細胞によるインシュリン産生が悪化もしくは喪失している糖尿病、(b) 上皮小体ホルモン産生の喪失が血清中のカルシウム濃度の低下を生じ、その結果重篤の筋肉テタニーを生ずる上皮小体機能低下症、(c) ドーパミン産生が低下したパーキンソン病および(d) エリスロポエチン欠乏症に対して二次的な赤血球産生の喪失により特徴付けられる貧血を含む。器官または組織機能の悪化または喪失は付随的な代謝機能の喪失を生ずる可能性がある。例えば、重症性の肝機能不全においては、肝臓超過の毒素の排除、細胞代謝生成物の排泄および必須生成物、例えばアルブミンおよび第VIII因子等の分泌が機能不能となる。ボンテンポ(Bontempo, F.A.等(1987)、ブラッド(Blood), 69, pp. 1721-1724)。

他の場合において、これらの因子は生物学的応答の修飾因子、例えばリンホカインまたはサイトカイン類であり、これらは患者の免疫系を増強し、もしくは抗-炎症剤として機能する。これらは慢性寄生虫性のまたは感染性の疾患に罹患した個体において特に有用であり得、また幾つかの癌の治療のためにも有用である可能性がある。また、患者に栄養因子、例えば神経成長因子またはインシュリン様の成長因子-1または-2 (IGF1 または IGF2) を与えることが望ましいこともある。

多くの疾患または欠乏症状態において、罹患した器官または組織は通常特定の代謝産物の濃度における揺らぎに 대응するような様式で機能し、結果としてホメオスタシスを維持している器官または組織である。例えば、上皮小体腺は通常血清中のカルシウム濃度における揺らぎに 대응して上皮小体ホルモン(PTH)の産生を調節している。同様に、ランゲルハンスの膵島細胞中の β 細胞は、通常血清中のグルコース濃度の揺らぎに responding してインシュリン産生を調節している。このような疾患の治療における伝統的な療法は、正常な組織のこのような揺らぎに対する応答性を複製し得ない。例えば、糖尿病に対して許容された治療法は日常的なインシュリンの注入を包含する。この治療法は、例えば過激な運動により生ずる血清中のグルコース濃度における急激かつ一時的な揺らぎを複製し得ない。このような複製を与え得ないことは糖尿病患者の合併症をもたらし、これは特に糖尿病の場合に顕著である。ジャレット(Jarret), R.J. & ケーン(Keen), J., (1976), ランセット(Lancet)(2): pp. 1009-1012.

そこで、多くの研究者が、分泌産物を与えるまたは代謝機能に影響を与える全器官、器官組織または細胞を移植することにより器官または組織機能の再構成を試みた。更に、移植は顕著な利点を与えるが、移植に適したかつ移植可能な器官の数が比較的小数であることによりその適用は制限されている。一般的に、移植片の免疫学的拒絶反応を回避するために患者を免疫抑制処理する必要があり、これは移植片の機能喪失および場合によっては移植組織または細胞の壊死を生ずる恐れがある。多くの場合において、該移植片は長期間に渡り、該患者の残された全寿命に渡りその機能を維持するものでなければならない。実質的に長期間に渡り患者を免疫抑制状態に保つことは望ましくなく、また経費もかかる。

このような移植法に代わる望ましい方法は、栄養物、排泄物および分泌産物の拡散を可能とし、かつ免疫的拒絶反応の細胞並びに分子エフェクターを遮断する身体的バリアー内での細胞または組織の移植である。分泌産物を産生する組織または細胞を免疫系から保護する種々のデバイスが開発されている。これらのデバイスは血管外拡散チャンパー、血管内拡散チャンパー、血管内限外濾過チャンパー、およびマイクロカプセル化細胞の移植を包含する。シャープ(Scharp), D.W.等(1984), World J. Surg., 8, pp. 221-9, これらのデバイスは、患者を免

特に述べない限り、ここで使用する用語「細胞(cells)」とは、任意の形状の、例えば組織内に維持されている細胞、細胞クラスターおよびばらばらに分離した細胞を意味するが、これらに限定される訳ではない。

本発明の免疫遮断性ビークルの該コアは孤立した特定の細胞に対して適当な局所的環境を与えるように構築されている。幾つかの態様においては、このコアは該細胞を維持するのに十分な液状媒体を含む。液状コアは形質転換された細胞、例えばPC12細胞を維持するのに特に適している。他の態様においては、該コアは該細胞を固定し、かつ分散し、高密度の細胞凝集体の形成を抑制したゲルマトリックスを含む。このゲルマトリックスはヒドロゲルまたは細胞外マトリックス成分を含むことができる。

ヒドロゲルマトリックスで形成されたコアは、凝集体を形成する傾向をもつ細胞、例えばランゲルハンスの島中の細胞もしくは膵島のクロム親和性細胞等を維持するのに特に適している。このマトリックスは、その中に細胞の分散状態を維持するために十分な粘性をもつものであるべきである。場合によっては、本発明のビークルのコアは該孤立した細胞の機能を維持もしくは増進する幾つかの物質を含むことができる。これらの物質は天然または合成栄養源、細胞外マトリックス(ECM)成分、成長因子または成長調節物質、もしくは一群の支持細胞または補助的細胞あるいは O_2 担体、例えばヘモグロビンおよびフルオロカーボン類を包含する。

以前に開発されたデバイスにおいては、該コアとジャケットとを以下の2種の方法の何れかにより逆に帯電したポリマー間のイオン結合により結合していた。即ち、(1) ラー(Rha)(U.S.P. No. 4,744,933)のデバイスは帯電した内部コア材料と反対電荷をもつ外部ジャケット材料とで構成された。また、(2) リムおよびサン(Lim & Sun)(U.S.P. No. 4,352,833および4,409,331)のデバイスは正に帯電しているポリ-L-リジン(PLL)の介在層を含み、これにより負に帯電したコアと負に帯電したジャケット材料とを結合した。PLL層の排除は、PLLが宿主内で組織形成誘導性であると考えられていることから有利である。PLLは、また幾つかの細胞に対して望ましかる成長作用をもつ可能性もある。更に、本発明のデバイスのジャケットはPLLで作成されたデバイスよりも良好に選択透過性を制御で

疫抑制状態に維持する必要性を軽減し、かつそれにより従来の移植技術では使用し得なかったドナー細胞または組織の利用を可能とすることにより、より多くの患者が回復性のまたは有利な移植片を受け入れることを可能とするので、これらのデバイスは移植の分野に顕著な進展をもたらすものと考えられている。しかしながら、これらの方法の何れも十分に長期間に及ぶ移植片機能を確保することはできなかった。必要な物質、例えば酵素およびホルモンの適量を放出または他の必要な代謝機能を長期間に渡り果たす方法は依然として開発されていないが、このような方法は長期間に渡る治療を要する患者にとっては極めて有利であろう。

発明の概要

本発明は生体適合性で、免疫遮断性(immunisolatory)の、移植可能なビークルに関する。本発明のビークルは、個体への移植に伴う身体の防御機構から生物学的に活性な細胞または物質を孤立させるのに適している。本発明のビークルは(a)単離した細胞を液状媒体中に懸濁した状態であるいはヒドロゲルマトリックスに固定化した状態で含むコア、および(b)選択的透過性(permeable)のマトリックスまたは膜でできた包囲もしくは周辺領域(「ジャケット(jacket)」)を含み、該周辺領域は隔離細胞を含み、生体適合性であり、かつ該コア内に隔離した細胞を免疫学的攻撃から保護するのに十分なものである。

ここで、「個体(individual)」なる用語はヒトまたは動物の患者を意味するものとする。

ここで定義するように、用語「二元マトリックスビークル(dual matrix vehicle)」とは細胞含有コアと、細胞を含まない外部ジャケットとをもつようなビークルを意味する。一態様においては、該マトリックスコアはヒドロゲルジャケットに、有利にはロードもしくは他の形状で架橋されたヒドロゲルの形状にある。該ヒドロゲルジャケットは架橋なしに該マトリックスを取り囲む鞘として独立に形成できる。該ヒドロゲルコアは必ずしも相反するイオン電荷により該外部ジャケットに結合されていなくともよい。もう一つの態様においては、該外部ジャケットは化学的結合により該コアマトリックスに結合されていない熱可塑性材料で形成されている。

きる。

本発明のビークルのジャケットは該コア材料と同一または異なる材料で作成される。何れの場合も、使用した該材料は選択透過性で、生体適合性のかつ免疫遮断性の包囲もしくは周辺領域を与える。

このジャケットは化学的に結合することなく該コアの周りに自由に形成でき、あるいは該ジャケットは該コアマトリックスに直接架橋することも可能である。何れにしろ、本発明のビークルの形成は界面層または該ジャケット内に存在する該コアに対して相反する電荷をもつポリマーの使用を必要としない。

好ましくは、該コアおよび外部ジャケットは相反する電荷をもつポリマー間の「イオン結合」をもたない、かつ従来のマイクロカプセルで使用された型の介在層を含まない界面を形成する。イオン結合とは、ある電荷(正または負)をもつコアと、反対電荷をもつジャケット(または中間層)との間のイオン性の相互作用を意味する。

このジャケットは所定のサイズの物質の透過を許容するが、大きな物質の透過を阻止する。より詳しく言えば、該包囲または周辺領域は所定のサイズ範囲内の孔または空間をもち、結果として該ビークルを選択透過性とするような方法で作成する。適当なビークルのために選定された分子重量断値(MWCO)は、一部には該ビークルを移植した後に透過する恐れのある関連した免疫学的拒絶反応の型およびその程度に基づき、また一部では該ビークル内に通過および/または該ビークルから外部に通過させるべき最大の物質の分子サイズに基づき決定されるであろう。例えば、ほぼClqサイズまでの分子、補体成分(約400kD)、細胞溶解性補体攻撃複体の組み立てに必要とされるタンパク等の透過を可能とする、選択的透過性膜またはヒドロゲルマトリックスを種々の材料を使用して形成できる。本例においては、Clqよりも小さな物質が自由透過できる。ほぼ免疫グロブリンG(約150kD)程度のサイズまでの分子を透過し、かつそれ以上の大きな分子を排除する選択透過性のマトリックスまたは膜を形成することも可能である。更に、ほぼ免疫グロブリンM(約1,000kD)程度のサイズまでの分子の透過を可能とする膜またはヒドロゲルを使用して、この態様では極めて大きな物質、例えば細胞等の透過のみが排除される。

上記ジャケットも生体適合性である。即ち、移植されたビークルの拒絶反応を生ずるのに十分なまたは該移植されたビークルを機能不能とするのに十分な有害な宿主応答を誘導しないものである。また、該ジャケットは望ましかめ組織障害性、例えば組織形成を誘発することもない。更に、その外部表面は、選択されたサイトにおける移植に特に適したものとするように選択または設計できる。周囲の組織の細胞による付着が望ましいか否かに応じて、該外表面は例えば平滑な面、点刺された面、または粗面であり得る。その形状並びに構造も選択された移植サイトに特に適するように選択もしくは設計することができる。

本発明のビークルの該ジャケットは、更に免疫遮断性である。即ち、このジャケットは該ビークルのコア中の細胞を、該ビークルを移植した個体の免疫系から防衛する。これは(1) 各個体の有害物質が該ビークルのコアに侵入することを防止することにより、(2) 該個体と該コア中に存在する可能性のある炎症性、抗原性またはその他の有害な物質との間の接触を最少化することにより、かつ(3) 該隔離した細胞と該個体の免疫系の有害な部分との間の免疫的な接触を阻止することにより十分な空間的なバリアーを設けることにより可能となる。本発明のビークルは、細胞の該コア外への突出の可能性を確実に阻止している外部ジャケットが存在する点で、リム&サンのマイクロカプセル(Liu, F. & Sun, A.H., Science (Sci ence), 1980, 210, pp. 908-910; Sun, A.H., メソズインエンジニアリング(M ethods in Enzymology), 1988, 137, pp. 575-579)とは区別される。リム&サンのマイクロカプセルは、封入された細胞部分がそのポリ- ϵ -リジン層を貫通して該コアから潜在的に突出していて、より一層宿主の免疫系からの炎症性の応答を誘発し易い可能性があるという欠点をもつ。このマイクロカプセル化技術は、該マイクロカプセルを形成するための潜在的に生活性のイオン結合の存在に依っている。そのイオンの特性のために、これらのマイクロカプセルは、カプセル移植後の宿主身体中に生ずる該イオン結合との結合のために、移植に伴う変質を起こし易い。この問題は本発明の単一非-イオン性のマイクロカプセルにより最少化される。本発明のマイクロカプセルのもう一つの利点は、単一のデバイス中に上記のマイクロカプセル技術で可能なレベル以上に多量の細胞を含め得る能力にある。

該包囲または周辺領域(ジャケット)はヒドロゲルマトリックス、もしくは別

の材料、例えば熱可塑性プラスチック等で作成し得る。また、例えばマトリックスで満たされた孔を有する選択透過性の熱可塑性プラスチック膜を形成し得るようなマトリックス-膜複合体から作成することも可能である。

該外部ジャケットは、好ましくは本明細書に記載の如き生体適合性であることが知られている熱可塑性プラスチック材料で形成してもよい。更に、該マイクロカプセルの分野で利用されている他のジャケット、例えば好ましくはカルシウム等の多価イオンで架橋されたアルギン酸塩などのジャケットも本発明で使用できる。

この免疫遮断性ビークルは(a) 高分子量物質を包含する広範囲の細胞生成物を必要に応じて各個体に引き渡すのに、および/または(b) 個体に、必要とされる代謝機能、例えば有害な物質の除去機能を与えるのに有用である。本発明のビークルは、個体に有効な量の必要とされる物質または機能を与えるのに細胞のまたは単一のビークルの移植で十分であるように、多量の細胞を含む。本発明のビークルにより与えられる別の利点は回収可能性である。

ランゲルハンスの島細胞に対して特に有用な本発明の好ましい態様の一つにおいては、該ビークルのコア並びに包囲または周辺領域両者はヒドロゲルであり、これらは同一組成のヒドロゲルまたは異なる組成のヒドロゲルであり得る。

本発明は、更に生体適合性で免疫遮断性のビークルの製法にも係わる。第一の態様においては、該ビークルは重状の孔をもつ押出しノズルから該コアおよび包囲または周辺領域を形成する材料を、該包囲または周辺領域(および該コア領域)の該マトリックスまたは膜先駆体をゲル化し、硬化し、かつ成形するのに十分な条件下で、同時に押出すことにより形成される。この同時押出しによる方法の特別な利点は、該コア内の細胞が該ビークルの形成時点から孤立されていることにあり、これにより該コア材料が移植前の該ビークルの硬化の層に汚染され、もしくは品質低下するのを確実に防止する。この同時押出し法の別の利点は、この方法が該包囲または周辺領域中に細胞並びに他のコア材料の侵入を確実に防止し得ることである。この包囲または周辺領域の透過性かつ生体適合特性は、使用するマトリックスまたは膜先駆体材料および該マトリックスまたは膜を形成する条件両者により決定される。

本発明の方法の第二の態様においては、該免疫遮断性ビークルを段階的に形成する。例えば、作成する該免疫遮断性ビークルが隔離された細胞を含有するヒドロゲルコアを含む場合には、該コアを先ず形成し、かつ該包囲または周辺マトリックスまたは膜をその後に組み込むか、あるいは適用する。逆に、該包囲または周辺マトリックスまたは膜を予備成形し、次いで予備成形した隔離-細胞含有コア材料またはコアを形成する材料(即ち、コア先駆体材料)でこれを満たすことも可能である。このビークルは、該コア材料を完全に包囲するように封止される。コア先駆体材料を使用する場合、該ビークルは次いでコアを形成する条件下に置かれる。

本発明は、更に生物学的物質または変更された代謝機能を必要とする個体に生物学的物質を分配しもしくは該個体の代謝または免疫機能を促す方法にも関連する。本発明の免疫遮断性ビークルは、該特定の免疫遮断性ビークルおよび移植サイトに対して選択された公知の技術または方法を利用して、個体(レシビエントと呼ばれる)に移植される。一旦移植されると、該生体適合性で免疫遮断性のビークル内に隔離された細胞は所定の物質を形成するか、あるいは所定の機能を果たす。生成物は、該隔離された細胞から遊離された後、選択透過性の該包囲または周辺膜またはヒドロゲルマトリックスを通過して、レシビエントの体内に送られる。該隔離細胞により代謝機能が与えられると、代謝(例えば、分解または不活性化)されるべき物質は該レシビエントの体内の該ビークルを出てレシビエントの血流から除去される。

かくして、本発明は更に生体適合性で免疫遮断性のビークル内に細胞を隔離して、該ビークル内の細胞を個体内に移植した後の免疫的攻撃から防衛する方法にも関連する。免疫応答性をもつ幾つかの低分子量の該物質(例えば、サイトカイン類)は該個体に対して透過性であるが、多くの場合これら物質の局所的濃度または処理濃度は有害な作用をもつほどには高くない。該隔離細胞は該レシビエントの免疫系による攻撃からおよび該移植されたビークルを取り巻く組織による潜在的な有害な炎症性の応答から保護される。このビークルのコアにおいて、該隔離細胞は適当な局所的環境下に維持される。このように、長時間に亘って、かつ危険な免疫抑制剤でレシビエントを処置する必要なしに、必要とされる物質ま

たは代謝機能を該レシビエントに付与できる。

図面の簡単な説明

第1図は、種々の分子サイズの腐質をテストするために、種々の条件下で形成したアルギン酸塩マトリックスの透過性における差異をグラフで表示した図である。

第2図は、インビトロで4週間に渡り維持された、免疫遮断された島細胞対未保埋状態の島細胞の機能性の灌注(perfusion)テストの結果をグラフで示した図である。第2A図は、ヒドロゲルコアマトリックスと選択透過性熱可塑性プラスチック製の周辺ジャケットとをもつ免疫遮断性ビークルについて得た結果を示す。第2B図は、ヒドロゲルコアマトリックスと周辺ヒドロゲルジャケットとを有する免疫遮断性ビークルについて得た結果を示す。

第3図は、第2図にも示した、灌注テストにおいて遊離したインシュリンの全量および第一並びに第二相応答中に遊離したその量をグラフで示した図である。第3A図は二元マトリックス免疫遮断性ビークルについて得られた結果を示し、第3B図はコアマトリックス-選択透過性膜の免疫遮断性ビークルについて得られた結果を示す。

第4図は、免疫遮断された異常発生性島細胞をストレプトゾトシン(streptozotocin)-誘発性糖尿病マウスに移植した場合に、60日間に渡り観察した血糖グルコース濃度における減少をグラフで示した図である。ここで使用した免疫遮断性ビークルは実施例5に記載の構造を有するものであった。

第5図は、実施例5に記載の構造を有し、インビボでの一定の滞留時間後に回収され、テオフィリン(theophylline)刺激の存在下並びに不在下でグルコースで誘発したラット島細胞を含む、免疫遮断性ビークルを使用した灌注実験で遊離されたインシュリンをグラフで表示した図である。

第6図は、免疫遮断された異常発生性島細胞をストレプトゾトシン(streptozotocin)-誘発性糖尿病マウスに移植した場合に、100日間に渡り観察した血糖グルコース濃度における減少をグラフで示した図である。ここで使用した免疫遮断性ビークルは実施例4に記載の構造を有するものであった。

第7図は、種々のテスト用物質に対するアルギン酸塩マトリックスの透過率をグラフで示した図である。透過率はハンス成中に保存した16および160時間後にテストした。透過率の変化は該マトリックスからのCa⁺⁺イオンの産出によるものである。

第8図は、熱可塑性プラスチックまたはアルギン酸塩ジャケットの何れかによって二元マトリックス免疫遮断性ビークル内に隔離し、次いで逆向性の免疫発生性レシビエント(モルモット)内でインビボにて一定の滞留時間経過後に回収したラットの島細胞のグルコース誘発に対する応答のグラフにより比較した図である。

第9図は、実験的に誘発させたパーキンソン病-様運動をもつ嚙歯自動物の、コアマトリックス中に制御クロム親和性細胞を含み、かつ選択透過性の熱可塑性プラスチック製の包囲ジャケットをもつ免疫遮断性ビークルの移植後の正常な運動性運動の部分的回復をグラフで示した図である。

第10図は、キノリン酸で損傷したラットに見られる平均体重の変動をグラフで示した図である。ウシ制御クロム親和性細胞を含む免疫遮断性カプセルを受容したラットは他の損傷ラットよりも著しく良好に体重を維持していた。

第11図は、腹腔内(白丸)または皮下(正方形)に移植した、(A) 1000個のラット島細胞または(B) 500個のラット島細胞を含むタイプ2アクリル酸ポリマーの中空繊維の移植後の、糖尿病マウスの非絶食状態における血糖グルコース濃度をグラフで示した図である。

第12図は、平坦なシート状のデバイス中に封入したラット島細胞を移植した糖尿病ラットの血中グルコース濃度に及ぼす効果をグラフで示した図である。

発明の詳細な説明

本発明は個体中に長期に渡り移植するのに適した生体適合性で、免疫遮断性のビークルに関する。その生体適合性のために、本発明のビークルは身体の種々の防禦系から、生物学的に有用な細胞および/または物質を長期に渡り隔離するのに適している。本明細書で使用する用語「防禦系(protective systems)」とは、本発明のビークルを移植した個体の免疫系に備わっていると考えられる免疫学的

ある。本発明のビークルを使用して放出させることの可能な物質は、通常種々の器官または組織により分泌されている広範囲の因子を包含する。例えば、インシュリンを糖尿病患者に与えることができ、またドーパミンをパーキンソン病に罹患した患者に与え、あるいは第VIII因子をタイプA血友病患者に与えることができる。本発明のビークルを使用して放出することのできる他の物質は栄養因子、例えばエリスロポエチン、成長ホルモン、物質Pおよびニューロテンシンを包含する。本発明のビークルを使用して放出するのに適した物質のもう一つの群は、生物学的応答性の変異因子、例えばリンホカイン類およびサイトカイン類を包含する。抗体分泌細胞由来の抗体も放出することができる。有用と思われる特異的な抗体は腫瘍特異性抗原に対する抗体である。抗体の放出もホルモンまたは成長因子等の化合物の濃度レベルを低下するのに有用であり得る。これらの物質は広範囲の疾病、炎症状態または疾患、および癌の治療において有用である。本発明のビークルはまた、肝細胞等の細胞による血流からの毒素または有害な代謝産物(例えば、コレステロール)の除去等の、活性な代謝機能を回復もしくは増進するのに使用することも可能である。本発明の方法並びにビークルはレシビエントの治療期間中に該レシビエントの免疫抑制を実施する付随的な必要性なしに、細胞を移植することを可能とする。この生体適合性で免疫遮断性のビークルの使用により、特定の物質のホモステアシスを長期間に渡り回復または維持できる。本発明のビークルは多数の細胞を含むことができ、その結果として個体に必要とされる有効量の物質または有効な程度の機能を与えるのに、単一のビークルの移植で十分である。

本発明の生体適合性で免疫遮断性のビークルは、(a) 生物学的に活性な部分(islet)を、症状媒体に患した状態またはヒドロゲルもしくは細胞外マトリックス内に固定化した状態で含有するコアと、(b) 隔離された細胞を含み、生体適合性であり、かつ該コア中に存在する隔離された細胞を免疫的攻撃から防禦するのに十分な、選択透過性マトリックスもしくは膜(ジャケット)の包囲または周辺領域とを含む。

本発明の目的にとって、生物学的に活性な部分は組織、細胞または他の物質であり、この生物学的に活性な部分はこれを含む本発明のビークルを移植した

装置の型、並びに他の拒絶反応メカニズム、例えば繊維形成応答、外来物体(foreign body)応答および該個体体内における外来物体の存在により誘発される可能性のある他の型の炎症性の応答などを意味する。本発明により記載されるような該ビークルの移植およびその内容物はインビボで3カ月以上に渡り、および多くの場合には1年以上に渡りその機能を維持する。更に、1個〜僅かに数個(10個未満)の移植されかつ容易に回収し得るビークルから完全に治療量の物質を放出するのに十分なサイズのものとして、本発明のビークルを調整することができる。

ここで使用する用語「生体適合性(biocompatible)」とは、集合的に完全なビークルその内容物両者を意味する。具体的には、移植された完全なビークルおよびその内容物の能力、即ち身体の種々の防禦系の有害な作用を回避し、かつ実質的な期間に渡りその機能を維持する能力を意味する。該防禦系由来の防禦応答または外来物質による繊維症応答の阻害に加えて、この「生体適合性」なる用語は特異的な望みしからぬ細胞毒性または全身性の作用が何等該ビークルにより生じないこと、およびその内容物が該ビークルのまたはその内容物の所定の機能を妨害しないであろうことをも意味する。

生体適合性および持続性のある機能性にとって重要なことは、該ビークルの形状、疎水性および該ビークルの表面上にまたは該ビークルから放出可能な形で望みしからぬ物質が存在しないもしくは放出されないことである。かくして、外来物質応答を誘発するブラシ型表面、ひだ状(folds)、中間層または他の形状もしくは構造の使用を回避する。ビークル形成材料は、該ビークル材料自体からの望みしからぬ物質の放出を防止するのに十分に緻密なものである必要がある。更に、ビークルの調整に引き続き、該ビークルの外表面に付着または吸収され、結果的に生成するビークルの生体適合性を低下するような液体または材料(例えば、血清)での該表面の処理は避けるべきである。

本発明は、また移植した細胞、組織または他の物質を免疫学的な攻撃から隔離または保護する方法にも関する。本発明の方法並びにビークルは、高分子量の生成物を含む広範囲の細胞生成物を、これらを必要とする個体に分配し、および/または個体に必要な代謝機能、例えば有害物質の除去機能を付与するのに有用で

個体に有用な生物学的効果を及ぼすことができる。かくして、この用語「生物学的に活性な部分」とは生物学的に活性な物質を分泌もしくは遊離する細胞または組織、例えば血流からの特定の物質の除去等の代謝能力または機能を与える細胞または組織、あるいは生物学的に活性な物質、例えば酵素、栄養因子、ホルモンまたは生物学的応答の変異因子を包含する。本発明の生体適合性で免疫遮断性のビークル内の該生物学的に活性な部分が細胞を含む場合、該コアは該ビークル内に隔離された細胞の持続性ある生存性および機能を維持するのに適した局所的環境を与えるように構成される。本発明のビークルは、十分に分化された足場依存性細胞または一次(primary)組織から、不完全に分化された胎児性のもしくは新生児期の組織並びに足場依存的な形質転換された細胞または細胞系までの範囲に及ぶ、広範囲の細胞または組織を免疫遮断するために利用できる。

多くの形質転換された細胞または細胞系は症状コアをもつビークル内に最も有利に隔離できる。例えば、PC12細胞(これはドーパミンを分泌し、かつここではパーキンソン病の治療のために有用であることが示される)は、コアが栄養媒体を含み、場合により細胞の生存性および機能を維持するための付随的な因子の存在状態、例えばウシまたはウマ胎児血清を含むビークル内に隔離できる。

好ましくは、該コアは細胞塊中の細胞の位置を安定化するヒドロゲルにより形成されたマトリックスで構成し得る。ここで使用する用語「ヒドロゲル(hydrogel)」とは、架橋された親水性ポリマーの三次元網状構造を意味する。該網状構造は実質的に水、好ましくは90%を超える水(これに制限されない)で構成されるゲル状態にある。架橋されたヒドロゲルは固体と考えることもできる。というのは、かなりの剪断応力が印加されないかぎり流動もしくは変形しないからである。

ヒドロゲルを形成する組成物は本特許出願の目的にとって2つの組に分割される。第一の組は正味の負の電荷を有し、かつコラーゲンおよびラミニン等の細胞外マトリックス成分により特徴付けられる。市場で入手可能な細胞外マトリックス成分の例はマトリゲル(Matrigel; 登録商標)およびビトロゲン(Vitrogen; 登録商標)を包含する。

例示の目的で、足場物質を必要としない細胞は、集合体または凝集体を形成でき、その結果相互に足場を与える細胞である。集合性細胞型の例は肝島細胞、肝

種のβ-細胞系、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、および副腎クロム親和性細胞である。これらの細胞はアルギン酸塩等の負に帯電したマトリックス内に有利に封入される。

組織芽細胞は一般的に正に帯電したマトリックス内で良好に生存し、従って細胞外マトリックス型のヒドロゲル中に有利に封入される。幾つかの細胞は迅速に増殖して、成長停止を示さない限りコア内の利用可能な空間中で過度に成長する可能性がある。該隔離した細胞が集合体形成の際に成長停止を示さない場合には、静止を誘発する物質を該ビークルの内部に含めておくことができる。幾つかの例において、ヒドロゲルコアは持続性のある増殖を制限するのに十分である。例えば、重合条件に最適化しないように、ヒドロゲルマトリックス先駆体溶液を含有させておくことができる。アルギン酸ナトリウムの場合、ヒドロゲルは移植後に、回りの組織からカルシウムイオンが取り込まれるにつれて、徐々に形成される。また、成長阻害因子あるいは分化誘導剤を徐々に分解されるポリマー、例えばポリカーボネート製のマイクロビーズに配合して、物質-分泌性細胞と共に共懸濁させることも可能である。例えば、NGF または PDGF を使用して、PC-12 細胞の分化を刺激し、細胞の分裂を終止することができる。

他の細胞、特に一次細胞または組織は相互に付着して、高密度の凝集体を形成する傾向があり、これは凝集された塊状体内に埋没した細胞の栄養物および酸素の相対的な入手不可能性のために中心部分に壊死領域を発生する恐れがある。これらの高密度の細胞塊は、高密度のコロニーへと細胞が成長する結果として徐々に形成されるか、あるいは細胞表面接着性タンパクにより媒介される断片に一分散された細胞または組織の再集合の際に迅速に形成される。著しく代謝活性の高い細胞または組織は特に酸素または栄養欠乏の作用に敏感であり、凝集体の中心部分に埋没されるようになった後、短期間内に死滅する。通常高密度の毛細血管床により支持されている多くの内分泌組織がこの挙動を示し、ランゲルハンスの島細胞および副腎クロム親和性細胞が特にこれに敏感である。この挙動を示す細胞または組織は最も適度に、該細胞または組織を固定化するのに十分なヒドロゲルマトリックスコアを含むビークル内で機能して、結果としてその大多数が栄養および酸素の入手性を確保する。他の状況下では、この固定化ヒドロゲルマトリッ

クスは更に、該隔離された細胞の所定の諸特性を維持するのに適したサイズおよび/または形状をもつ機能性の単位を生成もしくはは保存するという付随的な機能を達成する。更に、このコアマトリックスの存在は、該ビークル内における細胞または細胞クラスターの均一な分布の維持を可能とする(即ち、該コアマトリックスは該収容された細胞の固定を防止し、かつその移動性を低下する)。

特に有利なヒドロゲルの利用の1例は活発に分裂する細胞の封入である。アルギン酸塩または他のヒドロゲルを、封入すべき活発に分裂する細胞の懸濁液中に含めることができる。封入および該ゲルの形成後に、該封入された細胞は該ゲル内に幾分固定化され、かつ細胞分裂の際に生成される新たな細胞は親細胞近傍に局在化された状態を維持する。このようにして、細胞のクラスターが該コア内に生成される。このような成長法はMIT 細胞系由来のβ細胞等の場合において有利である。コアマトリックスが存在しない場合には、該カプセル化デバイスの内壁に沿って付着しつつ成長し、価値な細胞のみが該デバイスの空間内で自由に成長するに過ぎない。該カプセルの壁の上のみでの成長は、該ビークルの空間を満たすように成長する集団に対立するものとして、該カプセルの内壁の表面積により制限されるサイズの細胞集団の形成に導く。該コア内にアルギン酸塩が存在する場合、細胞の成長は最早該カプセルの内壁のみに制限されない。寧ろ、MIT 細胞の不連続な群が該コア全体に渡り生成され、かくしてアルギン酸塩の不在下で生ずる細胞集団に比して著しく多数の全細胞集団が形成される。

コアマトリックスの存在下においてさえ、所定のビークル体内に収容し得る組織フラグメントの大きさは個々のフラグメント内部の中心部分の壊死の出現により制限される。本発明の1局面によれば、該免疫遮断性ビークル内に配置できる組織フラグメントまたは細胞クラスターの有用な量は、改良された拡散特性をもつように該細胞を調整することにより高められる。一般に、これは、膜内に移植されるビークルに対しては径75μm未満、最も有利には径約35μm以下のサイズの組織フラグメントを調整することを意味する。改良された拡散型の細胞の凝集体またはクラスターは、酵素を使用して該組織を単一細胞および小さな細胞凝集体懸濁液内に分散することにより一時的に再凝集した細胞(例えば、脾臓細胞または副腎クロム親和性細胞)を調整し、次いで該改良された拡散性をもつ形

状に制御された状態で再凝集させることにより得ることができる。

本明細書において、用語「凝集(aggregating)」とは細胞のクラスター形成を促進する過程を意味する。クラスターを形成する細胞は天然産の凝集体塊、例えば脾臓細胞から得ることができ、これらは単一のまたは小一塊の懸濁液に分散されており、次いで公知の方法により再凝集される。また、該細胞は初めに単一細胞または小細胞塊として得、次いで所定のクラスターサイズとなるように凝集させることも可能である。このような細胞クラスターは一般に細胞の大きさおよび凝集特性に依存して約3〜400個の細胞を含む。典型的には、該クラスターは約10〜約50個の細胞を含む。再凝集された脾臓細胞の使用は、該コア内での適当な拡散特性を保证し、かつ該島細胞の生存性を維持するために有利である。再凝集された島細胞はより小さなカプセルの使用を可能とする。例えば、500個の非再凝集島細胞が、一般的に長さ約1cm(2%の密度)のカプセルを必要とする。これとは対照的に、完全な島細胞よりも小さな大きさに再凝集された島細胞を含むカプセルは、より効果的なパッキングのために長さ1〜2cm程度であり得る。より一層効果的なパッキングは、壊死コアの形成なしに許容される該細胞外部の低いpO₂を可能とする。低い外部pO₂に対して設定された許容度は少なくとも2種の利点をもつ。まず、より小さなカプセルサイズが同一数の細胞を収容するのに利用でき、即ち該インプラント内のより高い細胞密度が容易よく許容される。第二に、既知の低pO₂をもつ移植サイト、例えば皮下位置を容易よく利用できる。アルギン酸マトリックスの存在は、更に内部の細胞が栄養および/または酸素欠乏を生じる程に大きな細胞塊にまで、該凝集体が再凝集されないことを保証する。

脾臓細胞は依然として機能性を維持し、かつ酵素分泌および再凝集を伴って、殆ど正常な様式でグルコースに反応してインシュリンを分泌する。分散された島細胞由来の細胞は該ビークルに収容される前に所定のクラスターサイズまで再凝集される。再凝集はブリット(Brill)により開発された方法(ダイアベーツ(Diabetses), 3a, pp. 898-903)によりまたは同様な方法により達成できる。島細胞に対して最適な凝集サイズは、所定の生理学的特徴を依然として維持している最小のサイズである。次いで、該マトリックスまたはマトリックス形成材料を該細胞に添加し、この組み合わせを生体適合性で免疫遮断性ビークルに同時押出または

は成形する。必要ならば、次いでマトリックス形成を誘発させてもよい。好ましい態様においては、細胞を凍結せずに37℃にて一夜再凝集させる。凝集体の発生を、該凝集体のサイズが径25〜75μm、好ましくは35μmに達するまで光学顕微鏡で監視する。凝体の架橋されていないアルギン酸塩を、次いで該細胞に0.5〜2%の濃度となるまで添加し、該細胞をビークル中に組み込み、該ビークルを必要に応じて封止し、該ビークルをCaCl₂溶液中に浸漬することにより、その重合を誘発させる。

一次細胞または組織は、種々の医学的用途用の本発明のビークルで使用するのに有用である。調節上の理由並びに患者の安全性の理由から、一次培養物源として注意深く制御された遺伝上および発生上のバックグラウンドをもつ動物を使用することもしばしば有用であり得る。望ましくはウイルス、バクテリアおよび他の病原体の存在は、特定の病原体を含まないまたはノトバイオート級の動物の使用により避けることができる。特定の病原体を含まないまたはノトバイオート級の動物群の確立、注意および使用に関する基準並びに方法はマニアツ(Matias), O.P. 等, Can. J. Med., 1978, 42, p. 428; マシューズ(Matthews), P.J. 等(1981), 無菌研究における最近の進歩(Recent Advances in Germ Free Research), pp. 61-64, 東海大学出版局(Tokai Univ. Press); およびアイオワ州、コンラッドの、ザナショナルSPP スワインアクレディティングエージェンシー社(The National SPP Swine Accrediting Agency, Inc.)の刊行物であるザナショナルアクレディテーションスタンダードズ(National Accreditation Standards)に記載されている。

場合により、マトリックスコアはまた該隔離された細胞の機能性を維持し、もしくはは促進する物質を含むことができる。例えば、細胞外マトリックス(ECM)成分を、該隔離された細胞の特異的付着または接着の促進のために添加できる。或る種の細胞の成長を補助するのに特に適しているECM成分の組み合わせがクラインマン(Kleinman)等のU.S.P. No. 4,829,000に教示されている。該コアマトリックスは可溶性または遊離性の物質、例えば成長因子または成長調節因子等のリザーバ、もしくは該隔離された細胞への栄養または酸素の供給を増進または改良する天然または合成物質のリザーバを与えることができる。かくして、これは骨髄EC

4)と同様な様式で機能でき、該骨髄ECMは骨髄系統一特異的成長因子、例えば顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(gmcsf)等の様に避離するリザーバとして発動することが報告されている。ゴードン(Gordon, M.Y.等、ネイチャー(Nature), 1987, 326, pp. 403-405. かくして、該コアマトリックスは成長因子(例えば、ブラスチン、またはインシュリン-様成長因子2)、成長調節因子、例えば影響転換成長因子(transforming growth factor)β(TGFβ)または細胞芽腫遺伝子タンパクまたは栄養-輸送エンハンサー(例えば、該コア内に溶解した酸素濃度の増大を可能とするペルフルオロカーボン類)等として機能できる。これら物質の幾つかは、また症状媒体中に収容するのに適している。

また、支持細胞または補助細胞を該ビークル内に同時に隔離することも可能である。例えば、肝細胞を内皮補助細胞と共に同時に隔離することができ(カイ(Cai), Z. 等、アーティフィシャルオーガズ(Artificial Organs), 1988, 12(5), pp. 388-393)または島細胞と混合することができ(リコルディー(Ricordi)C. 等、トランスプランテーション(Transplantation), 1987, 45(6), pp. 1148-1151)あるいは制御クロム親和性細胞を神経成長因子(NGF)、該クロム親和性細胞の要求する物質を与える補助細胞と共に同時に隔離することができる。最後の場合において、NGF発現ベクターを移入した繊維芽細胞が該補助細胞として使用できる。

本発明のビークルは、また必要とされる薬物または生物学的療法剤の制御された放出用のリザーバとして使用することも可能である。このような場合には、該コアは細胞または組織を含有するというよりも、寧ろ選択された薬物または生物学的療法剤を高濃度で含有する。更に、隔離された細胞を含有する生体適合性かつ免疫遮断性のビークルを移植した身体の領域に好適な環境を調整もしくは生成する物質を含有するサテライトビークルをレシビエントに移植することも可能である。このような例においては、制御された量の、例えばレシビエントからの免疫応答をダウンモジュレート(down-modulates)または阻害する物質(例えば、抗-炎症性ステロイド類)または毛細血管床の内部成長を刺激する物質(例えば、血管形成誘導因子)を避離するサテライトビークルと共に、免疫遮断された細胞を含有するビークルを該領域に移植する。

本発明のビークルの包囲または周辺領域(ジャケット)は選択透過性で、生体

適合性かつ免疫遮断性である。これは、隔離細胞を含まず、かつ完全に該コアを包囲(即ち、隔離)し、結果として該コア中のあらゆる細胞とレシビエントの身体との接触を回避するように製造される。

先ず、該ジャケットの選択透過性を考察すると、該ビークルを移植した後に通過するものと予想される免疫学的反応の型およびその程度、および該ビークル内へ侵入するおよび該ビークルから出てゆく最大の物質の分子サイズ両者にとって適当なMWCO範囲を有するように、該ジャケットを形成する。レシビエントが置えている可能性のある免疫学的な攻撃の型およびその程度は、該ビークルの移植後に、一つにはその内部に隔離されている部分の型に依存して、また他方ではレシビエントの同一性(即ち、該レシビエントがどの程度該生物学的に活性な部分の源に隣接しているか)に依存する。該移植された組織が該レシビエントに対して同様である場合、免疫学的な拒絶反応は該移植細胞に対する該レシビエントの免疫細胞により細胞-媒介攻撃を通して大幅に進行する可能性がある。該レシビエントに対して異種のものである場合、該レシビエントの細胞溶解補体攻撃複合体(cytolytic complement attack complex)の組み合わせを介する分子攻撃が支配的となり、かつ補体との抗体相互作用が主体となる。

該包囲領域のMWCOは、従ってこれらの攻撃が起こるのに必要な物質の該コアへの到達を阻止するために十分に低くなければならない、かつ該レシビエントの身体への必要な物質の放出を可能とするのに十分に高くなければならない。従って、該MWCOは、該コアから免疫グロブリンGを排除する範囲内に厳密に制限する必要はないことは明らかであろう。事実、高いMWCOが許容されるばかりか、有利とさええる多くの場合が存在する。実際に、高いMWCOは免疫遮断された細胞から広範囲の有用な物質の放出を可能とし、しかも高分子量物質の代謝制御を与えるためにかかる細胞の使用を可能とする。

かくして、適当な場合には、該周辺または包囲領域はほぼC1q サイズ(約400kD)程度までの分子、即ち該補体攻撃複体の組み立てに必要とされる最大のタンパクの通過を可能とする選択透過性膜またはヒドロゲルマトリックスを形成する材料で作成できる。従って、ほぼC1q サイズ以下の任意の細胞性物質または代謝産物が該ビークルを自由に通過できる。他の場合においては、依然として免疫グロ

ブリンを排除することが望ましい可能性がある。このような場合には、免疫グロブリンGのサイズ(約150kD)と同程度のまたは該サイズを超える大きな分子を通過しないマトリックスまたは膜を形成する材料を使用できる。約150 kD未満の細胞性生成物または代謝産物は依然としてこのビークルを通過するであろう。患者が免疫抑制されている、または該移植された組織が該患者に対して同系であるような更に他の場合において、激しい免疫学的攻撃は起こらないように恐われ、また高分子量分子の通過は望ましい可能性がある。この後者の場合において、ほぼ免疫グロブリンM(約1,000kD)のサイズまでの全ての分子の通過を可能とする材料を使用できる。これらの材料は極めて大きな物質、例えば細胞の通過のみを阻止するであろう。

本発明のもう一つの局面によれば、従来意図されていたよりもかなり高い該ジャケットに対する分子量遮断値を使用し、一方で封入された細胞の生存性並びに機能を維持できる。

このことは、細胞が高分子量の物質を分泌するような用途で、該マクロカプセル(macrocapsules)を利用することを可能とする。この目的のために、言うなれば80~100 kDを超え、200~1000もしくは2000kD程度までの分子量遮断値をもつマクロカプセルが本発明に従って利用できる。

次に、包囲または周辺領域(ジャケット)の生体適合性を考察すると、この性質は因子の組み合わせにより該領域に与えることができる。先ず、該ビークルを形成するのに使用する材料は、該移植されたビークルがレシビエントの組織と適合性をもつかつ該組織に許容されるかに基いて選択される物質である。レシビエントあるいは該隔離された生物学的に活性な部分にとって無害な物質が使用される。好ましい物質は可逆的におよび不可逆的にゲル化可能な物質(例えば、ヒドロゲルを形成するもの)、および水-不溶性の熱可塑性ポリマーを包含する。特に好ましい熱可塑性ポリマー物質は適度に疎水性の、即ちブランドラップ(Brandrup)J. 等、ポリマーハンドブック(Polymer Handbook), 第3版、ジョンウイリー&サンズ, NYにより定義された溶解度パラメータが8~15、より好ましくは9~14(ジュール/cm³)^{1/2}であるような物質である。これらのポリマー物質は、有機溶媒に対して溶解性であるように十分に低く、かつ適当な膜を形成するように分

配されるべく十分に高い溶解度パラメータをもつように選択される。このようなポリマー物質は不安定な求核部分をもたず、かつ安定剤の不在下でさえオキシゲンおよび酸素類に対する高い抵抗性をもつべきである。特定の免疫遮断性ビークルに付与すべきインビボでの滞留期間も考慮すべきであり、生理的条件およびストレスに暴露された場合に十分に安定な物質を選択する必要がある。多くのヒドロゲルおよび熱可塑性プラスチックが知られており、これらはインビボでの長い滞留期間、例えば1~2年以上の期間に渡り十分に安定である。安定な物質の例はアルギン酸塩(ヒドロゲル)およびPAN/PVC(熱可塑性プラスチック)を包含する。

第二に、本発明の生体適合性で免疫遮断性のビークルの製造で使用する物質は浸透性もしくは有害で刺激性のまたは免疫原性物質を含まず、あるいはこのような有害物質を除去すべく徹底的に精製されたものである。その後、および該ビークルの製造中および移植前の該ビークルの維持中ずっと、十分に注意を払って該ビークルの生体適合性に悪影響を及ぼす可能性のある物質によるその汚染または不純化を防止する。

第三に、該ビークルの組織を含む外的構造は、移植後にレシビエントの組織との異種の界面を与えるような様式で形成される。このパラメータは一部には移植サイトにより規定されるであろう。例えば、該ビークルを該レシビエントの腔腔に移植する場合、その表面は平滑であるべきである。しかしながら、該レシビエントの軟質組織中に埋設する場合には、該ビークルの表面は適度に粗くもしくは点状であり得る。一つの決定因子は該レシビエントの細胞が該ビークルの外表面に付着可能とすることが望ましいか否か、あるいはかかる付着を回避すべきかどうかである。開放-組織状(open-textured)またはスポンジ状の表面は、毛細血管床の内向成長を促進し、一方で平滑表面は繊維芽細胞による過度の成長過多を阻止し得る。繊維芽細胞による過度の成長過多は、毛細血管の不十分な成長が起る場合を除き、回避すべきである。該成長不十分は該ビークルの回りに低過度の基底膜の堆積を起こし、該隔離された細胞とレシビエントの身体との接触の遮断を生ずる可能性がある。

幾つかのビークル幾何形状も特異的に外來物質組織形成応答を誘発することが

見出されているので、回避すべきである。従って、ビークルはブラシ状表面のまたはひだ状等の中間層を有する構造を有すべきではない。一般的に、同一のまたは隣接するビークルとの対向するビークル表面または端部は少なくとも1mm、好ましくは2mmを超えるおよび最も好ましくは5mmを超える間隔を保つべきである。好ましい態様は円形、U-字型円筒および平坦なシートまたはサンドイッチ形状を含む。

本発明の生体適合性かつ免疫遮断性ビークルの包囲または周辺領域(ジャケット)は、場合により移植されたビークルに対する局所的炎症性応答を減少もしくは阻害し、および/または該移植された細胞または組織に対して好ましい局所的環境を発生または促進する物質を含むことができる。例えば、免疫反応の1種以上の媒介因子に対する抗体を含めることができる。利用可能な潜在的に有用な抗体、例えばリンコカイン腫瘍壊死因子(TNF)、およびインターフェロン(IFN)に対する抗体を該マトリックス先駆体溶液に添加できる。同様に、抗炎症性ステロイドを含めることもできる。クリステンソン(Christenson), L. 等, J. Biomed. Mat. Res., 1989, 23, pp. 705-718; クリステンソン(Christenson), L. (1989), Ph.D.論文、ブラウンユニバーシティ(Brown University)。これらを本発明の参考文献とする。また、血管形成誘導(毛細血管床の内成成長)を刺激する物質を含めることもでき、これは特に隔離された細胞または組織が適当に機能するためにレシビエントの血液との密な接触を必要とする場合(例えば、ランゲルハンスのインシュリン-産生島細胞)に望ましい。抗体を分泌するように遺伝子操作された細胞を該マトリックス中に含めることができる。

免疫遮断性の概念を考察すると、該包囲または周辺領域には、更に該ビークルを移植した個体の免疫系からの生物学的に活性な部分の防禦性が付与される。この防禦性の付与は該ビークルのコアへの該個体身体の有害物質の侵入を防止することにより、および該隔離された部分と該個体の免疫系との間の有害な免疫的接触を防止するのに十分な物理的バリアーを設けることにより達成される。この物理的バリアーの厚みは変えることができるが、該バリアーの何れかの側における該細胞および/または物質間の直接的接触を防止するのに十分に厚くしなければならない。この領域の厚みは、一般に5~200 μ の範囲内にあり、10~100 μ の範

く、本発明のビークルのコアからのIgGの排除が免疫防禦の基準ではない。というのは、IgGのみでは該ターゲット細胞または組織の細胞溶解を生ずるのに不十分であるからである。好ましくは同種組織を含む本発明のマクロカプセル(異種移植でもよい)を使用すれば、必要とされる高分子量生成物を放出し、もしくは高分子量物質に関連する代謝機能を与えることができる。但し、免疫的攻撃を媒介するのに必要な必須物質はこの免疫遮断性ビークルから排除されることが条件となる。これらの物質は該移植体攻撃細胞成分C1qを含む、あるいは食細胞または細胞毒性細胞を含む可能性があり、本発明の免疫遮断性ビークルはこれらの有害な物質と該隔離された細胞との間に物理的バリアーを与えている。かくして、本発明の免疫遮断性ビークルは、広範囲の分子サイズの生成物、例えばインシュリン、上皮小体ホルモン、インターロイキン3、エリスロポエチン、アルブミン、トランスフェリンおよび第VIII因子等を、同種または異種細胞または組織から放出するのに利用できる。

本発明の他の態様においては、神経系の変質により発生する疾患の治療法を提供する。神経系の変質と関連すると考えられているヒトの疾患の例はアルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、エイズ(AIDS)-関連痴呆、およびパーキンソン病を含む。

神経系変質状態の動物モデルは、特殊な変質がニューロンを損傷または死滅するという前提に基づいている。幾つかの場合においては、これは更に段階的な神経系の死滅に導き、これは更に特定の脳機能のための応答経路に沿った栄養上相互に依存したニューロンにも影響を与える。

神経系変質状態の治療法は、(1) シナプス後部ニューロンに対する更なる損傷を防止するために、および(2) 変質の影響を受けた細胞の生存性を改善するために、成産または栄養因子を局所的に投与することを含む。ニューロンの生存性を改善することが知られている因子は基底神経芽細胞成長因子、シリア線毛(cilia ry) 神経栄養因子、脳-由来の神経栄養因子、ニューロトロフィン(neurotrophin)-3、ニューロテニンおよび物質Pを含む。

神経劣化毒性促進性(excitotoxicity)の1動物モデルにおいて、グルタメート曝露は、キノリン酸は接触能動的に、細胞および/または基底動として知られ

るの厚みが好ましく、かつ20~50 μ の範囲内の厚みが特に好ましい。本発明のビークルの使用により阻止または最小化し得る免疫学的攻撃の型はマクロファージ類、好中球類、細胞性免疫応答(例えば、ナチュラルキラー細胞および抗体-依存性T細胞-媒介細胞溶解(ADCC))および炎症性応答(例えば、抗体-依存性細胞媒介細胞溶解)による攻撃を包含する。

上で議論した如く、該移植したビークルに対するレシビエントによる免疫応答の型およびその程度は該レシビエントと隔離された生物学的に活性な部分との相関により影響される。例えば、該隔離された物質が同系細胞を含む場合、レシビエントが該ビークル内の特定の細胞または組織型に関して自己免疫性を示さない限り、これらは激しい免疫反応を起こさない。最近自己免疫性病因を有することが見出された疾病または疾患状態、特にタイプ1、インシュリン-依存性真性糖尿病等があり、ここではインシュリン分泌細胞が該個体の免疫系により破壊される。ファン(Fan), M.-Y. 等, ダイアベーツ(Diabetes), 1990, 39, pp. 519-522。

同系細胞または組織は簡単に入手できる。多くの場合、同種または異種細胞または組織(即ち、予想されるレシビエントと同種のドナーからの、または該レシビエントとは異種のドナーからの細胞または組織)が入手できる。本発明の免疫遮断性ビークルは、付随的なレシビエントの免疫抑制の必要なしに、かかる細胞または組織を移植することを可能とする。従って、本発明のビークルは従来の移植技術によって治療し得る以上に多くの個体を治療することを可能ならしめる。例えば、ヒトドナー島細胞を移植し得る患者以上の患者がタイプ1糖尿病に罹患している(1990年には、全器官移植につき約4,000以下の適当な死体の器官ドナーが米国で入手できたにすぎない)。ドナーとしてのブタまたはウシの島細胞の供給量はより一層多量にあり、これらの異種島細胞が本発明に従って適当に免疫遮断されたなら、より一層大多数の患者の糖尿病状態を治療できる。異種間移植組織に対する免疫応答の型および強さは、同系または同種の組織をレシビエントに移植した場合に見られる応答とは異なることが予想される。この拒絶反応は主として細胞-媒介または抗体-媒介攻撃により進行すると考えられ、特定の場合における決定パラメータは殆ど理解されていない。しかしながら、前に述べた如

く、本発明のビークルは、ハンチントン病に罹患した患者と同様な神経病理学的状態および症状を発生させる。モデルとしてのおよび実際のハンチントン病両者は、運動性調節の際に必要なニューロンの損傷により特徴付けられる。

更に、ハンチントン病の初期症状の1つは体重の減少である(サンベルグ(Sanberg), P.R. 等, Med. J. Aust., 1981, 1, pp. 407-409)。同様な効果は該モデル系においても見られる(サンベルグ(Sanberg), P.R. 等, Exp. Neurol., 1979, 65, pp. 444-466)。キノリン酸も、エイズ(AIDS)-関連痴呆において異常に高い濃度で見出される。

本発明に従えば、適当な因子を分泌する生きた細胞を含むビークルを移植することにより栄養因子が適当な脳領域に与えられる。好ましくは、該細胞は少なくとも1種の因子、即ち基本的(basic) 神経芽細胞成長因子を分泌することが知られている副腎クロム親和性細胞である。クロム親和性細胞は今のところ未確認の他の栄養因子をも分泌し得る。本発明のこの態様は、パーキンソン病の症状を改善するために神経伝達物質、ドーパミンを分泌するクロム親和性細胞の利用とは区別されることに注意すべきである。神経成長因子-分泌細胞、例えばNGFを発現するように操作された神経芽細胞は、このキノリン酸誘発神経変性のもう一つの治療法を与える。ミエリンから調製されたシュワン細胞をカプセル化して、適当な脳領域に移植し、パーキンソン病に関連する神経変性を防止することも可能である。

本発明の別の態様では、該動物モデルはフィンブリュー円錐の創傷を含む。特に、セプト海馬系のニューロンはアキソトミズされ(axotomized)、これは劣化および細胞の死滅をもたらす。このモデルはヒトにアルツハイマー病を生ずる損傷の型と類似すると考えられる。好ましくは、NGFを分泌する細胞を含むビークルを移植することにより成長因子、即ち神経成長因子(NGF)を与える。不死化(例えば、ラージT抗原(Large T antigen)での形質転換により)したおよびNGFを発現するように遺伝的に操作された神経芽細胞を使用できる。好ましくは、該細胞は超量NGFを生産するように遺伝的に操作された神経芽細胞である。この神経芽細胞は、細胞外マトリックスを模倣したマトリックス材料、例えばコラーゲンまたはラミニン-含有ヒドロゲルからなるコア内で最も良好に生

存する。このコアは免疫遮断性ジャケットで包囲されており、該ジャケットとは該コア内では細胞まで酸素および栄養分を拡散することを可能とし、また分泌されたNGFが該ジャケットを通して拡散して、レシビエントの体内に浸出することを可能とする。該ビークルのインプラント材はコリン作用性のニューロンの死滅を阻止し、このことはコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)、生きたコリン性ニューロンの指示薬を含む多数のニューロンを使用したアッセイから明らかにされた。

フィンブリエー円蓋の損傷は、該モデルの動物機体に行動性の低下(学習および記憶を含む作業に容易に見ることができ)を生ずる。フィンブリエー円蓋の損傷をもつラットに長期に渡りNGFを投与すると、該動物の運動性の回復が促進されることが報告された(ウィルス(Wills), B. 等, Behav. Brain Res., 1985, 17, pp. 17-24)。本発明においては、NGF-分泌細胞を含有するビークルの移植により、該損傷をもつ動物の適当な脳領域に連続的にNGFを放出する実際的な方法が提供される。簡便から、本発明のビークルは、特定の脳領域に連続的にNGFを放出することにより改善し得る状態にあるアルツハイマー病の患者のための治療および/または予防的治療の実際的な方法を提供する。

本発明の免疫遮断性ビークルは広範囲の形状に成形でき、かつ適当な材料と組み合わせることができる。細胞が存在する場合、該ビークルの特定の形状の選択の際に先ず第一に考慮しなければならないことは、該隔離された細胞の酸素および栄養の入手性並びに廃棄代謝物、毒素および該ビークルから分泌された生成物の透過である。本発明の免疫遮断性ビークルは、生物学的活性を維持し、かつ該生成物の放出性または機能の利用率を確保するのに適した任意の構造並びに形状であり得、例えば円筒状、矩形、円盤状、パッチ型、卵型、星型または球状等を含む。更に、該ビークルはメッシュ状または巣状構造に巻き取ることも可能である。このビークルを移植後に回収する場合、移植したサイトからの該ビークルの移動を容易にするような形状、例えばレシビエントの血管内を移動するのに十分に小さな球状の形状は好ましくない。幾つかの形状、例えば矩形、パッチ形状、円盤状、円筒状および平坦なシート形状が高い構造上の一体性を与え、かつ回収が望まれる場合に好ましいものである。

状況の下では、これら要素は該コア材料(例えば、成形した熱可塑性プラスチッククリップ)の隔離を完成するように、該包囲または周辺領域を(例えば、円筒状のビークルの端部または円盤状のビークルのエッジ部分において)堅固に封止するように機能し得る。多くの形状に対して、これら構造要素が該選択透過性の包囲または周辺領域のかんりの領域を占有しないことが望ましい。

好ましい1型様において、本発明の移植可能な免疫遮断性ビークルは、その移植後に完全に回収するために、十分なサイズおよび耐久性をもつものである。1 μ lなる典型的な最大の実用体積をもつマイクロカプセルと対比させる目的で、本発明の好ましい免疫遮断性ビークルを「マクロカプセル(macrocapsule)」と命名した。このようなマクロカプセルは約1~10 μ lの範囲内の好ましい最小体積をもつコアを有し、かつ用途に応じて100 μ lを超える体積をもつマクロカプセルを容易に製造できる。

回収性に関連して、微小球は一般にマクロカプセルと比較して実用的でない。組織を微小球内にカプセル化して治療量のインシュリンを与えるためには、例えば微小球の数を、実質上の回収性が不可能となるような程度にまで高める必要がある。また、微小球内に配置する組織の体積増加はこれに応じた表面積の増加を必要とする。球内において、表面積の尺度は r^2 であり、体積の尺度は r^3 であるから、カプセル化される組織の体積が増大するにつれて、該カプセル化された組織に栄養分を拡散させるのに十分な表面積を与えるに要するカプセルのサイズは急速に実現不能なサイズに増大する。

円筒型または平坦なシート形状のマクロカプセルにはこのような制限はない。というのは、増大した量の組織への栄養並びに生成物の拡散による輸送が、全ビークルサイズの不当な増加なしに、表面積を増やすことにより調節し得るように表面積に比例的に体積が増大するからである。糖尿病患者において正常血糖値を回復するために体重1 kg当たり、例えば約10,000個の島細胞が必要とされる場合には、体重1 kg当たり1,000 ~ 10,000個のマイクロカプセル(例えば、1~10島細胞/カプセル)を移植する必要がある。このマイクロカプセル数は、回収が必要とされる場合には、容易に回収し得ない量である。これとは対照的に、本発明のマクロカプセルでは、ビークル当たり1,000 島細胞以上から500,000 島細胞程

本発明のビークルにおいては、少なくともその一次元において、コア中のあらゆる隔離された細胞に、レシビエントの血液を包含する周辺組織との十分な接触状態を与えて、該隔離細胞の生存性並びに機能を維持する必要がある。しかしながら、該ビークルを形成するのに使用した材料の拡散上の制限のみが、全ての場合において、その形態上の限界を規定する訳ではない。幾つかの添加物を使用でき、該添加物は基本的なビークルの該拡散特性、または栄養または酸素輸送特性を変更もしくは増強する。例えば、内部媒体を酸素で飽和したペルフルオロカーボン類と共に補充して、血液に担持された酸素との直接接触の必要性を減ずることができる。これにより、隔離された細胞または組織が生存性となり、かつ例えばアンギオテンシンが勾配をもって該ビークルから周辺の組織に遊離され、毛細血管の内向成長が刺激されることとなる。ペルフルオロカーボン類の使用法およびその使用の基準はフェイスフル(Faithful), N.S., アネステシア(Anesthesia), 1987, 42, pp. 238-242 およびNASA Tech ブリーフス(Briefs) MSC-21460, 米国政府出版局(U.S. Govt. Printing Office), ワシントンD.C. 20402に与えられている。これらを本発明の参考文献とする。クローン細胞系、例えばPC12細胞に代わるものとして、遺伝的に操作されたヘモグロビン配列を該細胞系に組み込んで、優れた酸素貯蔵性を獲得することができる。NPO-17517 NASA Tech ブリーフス(Briefs), Vol. 15 #1, p. 54。

一般に、細胞が存在する場合において、酸素担持系添加物がない場合には、該ビークルは、少なくとも1次元において2 mm程度の最大深さ対表面距離を有し、最大深さは800 μ mであることが好ましい。1または数個のビークルがレシビエント中での所定の効果を得るために必要とされる可能性がある。

この免疫遮断性ビークルのジャケットの厚みは、該ビークルの存在に対する該患者による免疫応答を防止するのに十分な大きさであるべきである。このためには、該ビークルは細胞を含まない位置で1 μ m以上の最小の厚みをもつことが好ましい。

また、増強構造要素を該ビークルに組み込むことが可能である。これらの構造要素は、不透透性であり、該ビークルをレシビエントの組織に束縛し、もしくは保留することを可能とすべく適当な形状を付与するように作成される。幾つかの

度までを容易に収容できる。好ましい型様では、患者当たり5~10個未満のビークルを必要とし、大量のマイクロカプセルよりも一層容易にこのマクロカプセルを回収できであろう。

本発明のマクロカプセルは、10⁴ 個以上の細胞を含み、かつこれらを生存条件下に維持できるというマクロカプセルの能力の点で、マイクロカプセル(サン(Sun), A.M., 上記文献; リー(Rha), C-K., U.S.P. No. 4,744,933)とは区別される。細胞の生存性を確保するために、マイクロカプセルの製造において使用される技術は、当然のことながらカプセル当たりの細胞数を10⁴ よりも小さな値に制限する。

本発明は、また免疫遮断性ビークルの製造法にも関連する。まさに述べたように、本発明のビークルは、完全に分化した、足場-依存性の、胎児性または新生児のもしくは形質転換された、あるいは足場-独立性の細胞または組織を包含する種々の細胞または組織を移植するのに利用できる。免疫遮断すべき細胞はドナー(即ち、成人、新生児および胎児細胞または組織を包含する一次細胞または組織)またはインビトロで複製する細胞(即ち、遺伝的に変性された細胞を含む不死化された細胞または細胞系)の何れからかから調製される。全ての場合において、必要な生成物の有効量を生成し、あるいは必要な代謝機能を有効レベルで付与するのに十分な量の細胞を、一般的には無菌条件下で調製し、隔離する前に適当に(例えば、ハンス塩溶液等の均衡溶液、またはハムス(Ham's) F12 等の栄養培地中)に維持する。

本発明の他の局面においては、該マクロカプセルは、患者からの栄養が容易に細胞内に移行し、もしくは該細胞が代謝機能、例えばコレステロールとの相互作用を生ずるように患者のタンパクの該細胞への移行を可能とするように、その中心とジャケットに最も近接した部分との間の距離が減少する傾向をもつ形状をもつものである。この点に関連して、球以外の形状、例えば長いチューブ状または平坦なシート状等が好ましい。この目的にとって最適な形状はここに記載するような公知の技術に従って計算できる。

本発明の生体適合性免疫遮断性ビークルのコア内に配置すべき細胞の数または組織の量(即ち、添加密度)に影響を与える4種の重要なファクタは(1) ビ

ークルのサイズおよび幾何形状、(2) 該ビークル内での有糸分裂活性、(3) コア部物質および/または添加物の粘性要件、⁶ および(4) 予備-移植アッセイおよび適性要件である。

上記第一のファクタ(即ち、カプセルのサイズおよび幾何形状)に関連して、該細胞への必須栄養分の供給および代謝要件、並びに該細胞からの廃物の排出に供する要求が該細胞の連続的な生存性にとって臨界的な条件である。該ビークルの内容物への供給による接近はビークルの表面積により制限されているので、ビークルの種々の形状およびサイズの表面对称性の関係は、該ビークル内にどれだけ多くの生きた細胞を維持できるかを決定する上で臨界的な条件となろう。該代謝に供する要件の中で、該ビークルへの物質の供給により満たされるのは酸素に対する要件である。特定の細胞の酸素要件は選択された細胞毎に決定する必要がある。酸素代謝に関する方法並びに基準はウィルソン(Wilson, D.F. 等, J. Biol. Chem., 1988, 263, pp. 2712-2718)に与えられている。鳥細胞の酸素要件は、該ビークルの壁および組織の隔壁(コア)を介する周辺組織からの拡散輸送に起因する組み合わせられた拡散反応モデルに適用され、かつ幾つかの異なるサイズおよび形状をもつビークル中の鳥細胞の予想された生存率を、ディオン(Dionne, K.E., (1989), セシス(Thesis) Ph. D., マサチューセッツ工科大学(Massachusetts Institute of Technology))の方法に従って算出するのに使用した。完全な群鳥細胞については、これらの計算は実験的既測とよく一致している。腹腔内に移植($PO_2 = 45-50$ mmHg)された外径900 μ をもつ円筒状のビークルについては、最適細胞体積は、該ビークル体積の20%まで、好ましくは1~15%の範囲、最も好ましくは約5%である。(このカプセルが長さ20cmであると、その体積は100cm³であろう)。例えば、かなりの量の組織を支持するために、単一の球として同一の表面積を与えるためには、体積1,047mm³が必要とされよう。400 μ の円筒状のビークルに対しては、最適の細胞体積は全ビークル体積の35-65%の範囲、好ましくは35%である。これらの計算においては移植サイトにおける酸素分圧をも考慮している。該酸素分圧が腹腔内の値(例えば、皮下で $pO_2 = 20$)以下である移植サイトにおいては、低添加密度の使用が必要とされよう。動脈(pO_2 95mmHg)および脳(pO_2 75mmHg)への移植はビークル1個当たりのより大きな組織体積の維持

を可能とせらう。他のビークルの形状、例えば円筒状または球状も可能であり、最適細胞体積はこれら幾何形状に対して同様に算出される。実際の添加密度はこれらの拡散のみならず、以下に与える事項をも考慮して決定される。

第二のファクタ(細胞分裂)に関連して、選択された細胞が該ビークル内にいてさえ活発に分裂することが予想される場合には、該細胞は利用可能な空間を満たすまで、または接触阻害等の現象によりそれ以上の分裂が制限されるまで分裂を継続せらう。細胞の複製のために、該ビークルのサイズおよび幾何形状は、該ビークルのコアの完全なる充填が拡散の制限による必須栄養の欠乏をもたらないように選択される。一般に、細胞または組織で満たされるであろうビークルの断面積は250 μ 程度であり、その結果該ビークルと外部拡散表面との間に15個未満、好ましくは10個未満、より好ましくは5個未満の内部細胞を有する。

一般的に、該ビークル内で分裂しないと予想される細胞、例えばクロム様性細胞、群鳥細胞等については、適当な細胞密度は上記の拡散に関する考察から算出されよう。

第三のファクタ(即ち、コア材料の粘度)に関連して、ビークル体積の70%までを占有する密度の細胞を生存させることができるが、この密度範囲内の細胞密度はかなり粘固であろう。極めて粘固な溶液中の細胞の該ビークルへの組み込みは実施不能な程に難しい。一般的に、以下で議論する二段階法および同時押し込み法両者に対して、30%を超える密度での細胞の添加は余り有用ではなく、一般に最適添加密度は20%以下である。組織のフラグメントに関して、内部の細胞の生存性を維持するためには、上記と同様な一般的ガイドラインに従うことが重要であり、かつ組織フラグメントは径250 μ を超えず、該組織と最近接拡散表面との間に15個未満の、好ましくは10個未満の内部細胞をもつ。

最後に、第四のファクタを考察すると、多くの場合ビークルの調製と移植との間にある一定の時間を置く必要がある。例えば、該ビークルをその生物学的な活性を評価することが重要である。従って、有糸分裂的に活性な細胞の場合、好ましい細胞添加密度は、この評価アッセイを実施するために存在する必要がある細胞数を考慮する必要がある。

多くの場合において、インビボで移植する前に、該ビークル内での該生物学的

に活性な部分の有効性を確立するためのインビトロアッセイを利用することが重要であろう。対象とする部分を含有するビークルはモデル系を使用して機能試験が可能である。本発明の好ましい態様においては、該ビークルへのグルコースの供給を、群鳥細胞からのインシュリンの遊離を刺激するために利用する。該ビークル外へのインシュリンの出現を適当な特異的ラジオイムノアッセイを利用して監視する。かかる手順は、細胞1個当たりのあるいは単位体積基準での該ビークルの有効性の決定を可能とする。

ビークルの充填並びにビークルの有効性の決定のための上記のガイドラインに従って、次に移植のための実際のビークルのサイズを特定の用途に必要とされる生物学的活性の大きさに基づき決定する。治療物質を遊離する分泌性細胞の場合には、当分野で公知の標準的投与量の考察および基準を必要とされる分泌物質の量を決定するのに使用する。考慮すべきファクタはレシビエントの大きさおよび体重、該細胞の生産性または機能の程度、および必要な場合には機能交換もしくは増大すべき器官または組織の正常な生産性または代謝活性を包含する。該細胞部分が免疫遮断性および移植手順を許し得ないか否か、並びに該インプラントの有効性を妨害する状態をレシビエントが有するか否かを考慮することが重要である。本発明のビークルは数千個の細胞を含む状態で容易に製造できる。好ましい態様においては、インシュリン欠乏症ラットにインシュリン産生を付与するのに使用される治療上有効な免疫遮断性ビークルは1,000個程度の鳥細胞を含む。より大きなビークルも本発明の方法によって有利に製造することができる。この免疫遮断性ビークルの潜在的に大きな能力のために、多くの症状の治療が、適当な治療上の投与量を達成するのに、僅か1個または多くとも数個(10個未満)のビークルの移植が必要とされるに過ぎない。多数の細胞を含有する治療上有効な移植可能なビークルの僅か数個のみの使用は回収の簡便化をもたらす。これは多くの用途において多数のビークルを必要とする微小球または他の小さな形状のものよりも好ましい。本発明の免疫遮断性マクロカプセルは、その壁に依存して10,000~100,000個の細胞乃至500,000個またはそれ以上の細胞をばらばらにあるいはクラスターとして保持することを可能とする。

選択された物質を生成する細胞または組織の単離技術および手順は当業者には

周知であるか、あるいはほんの日常的な実験のみで公知の手順を改良できる。例えば、ランゲルハンスの島細胞は動物(例えば、ヒトまたはブタ)の膵臓から、シャープ(Scharp, D.W. 等(1989), U.S.P. No. 4,868,121に記載されたような機械的剪断とコラーゲナーゼ消化との組み合わせを利用して単離できる。鳥細胞は小動物、例えばラットからシャープ(Scharp, D.W. 等の方法(ダイアベーツ(Diabetes), 1980, 29, 別冊1, pp. 19-30)により単離できる。同様に、肝細胞は肝臓から、サン(Sun, A.M. 等, Biomat. Art. Cells Art. Org., 1987, 15(2), pp. 483-496に記載されたように、コラーゲナーゼ消化および引き抜いての組織断面を利用して単離できる。副腎クロム様性細胞はリベット(Livett, B.G., フィジオロジーレビュー(Physiology Reviews) 1984, 64, pp. 1103-1161の方法に従って単離できる。一次ドナー組織を使用して得ることが困難な多くの細胞生成物を不活化した細胞または細胞系を使用して与えることができる。不活化した細胞は無限に複製でき、かつ融合した場合に接触阻害を示さず、しかも該形成性のないものである。不活化した細胞系の例はラットのクロム様性細胞腫(pheochromocytoma)細胞系PC12である。形質転換された細胞または細胞系も同様に使用できる。形質転換された細胞は、融合した際に接触阻害性を呈さず、かつ同種宿主に移植された場合に腫瘍を形成する点で単に不活化した細胞とは異なる。不活化は長期に渡る選択された生成物の放出または代謝機能の発現のための、株または周知の細胞型または組織の使用を可能とする。細胞の不活化の適当な技術はランド(Land, H. 等, ネイチャー(Nature), 1983, 304, pp. 596-602およびセプコ(Cepko, C.L., ニューロン(Neuron), 1988, 1, pp. 345-353)に記載されている。胰臓細胞系はインシュリンを分泌する遺伝的に操作された β -細胞系、例えばNIT細胞(ハマグチ(Hamaguchi, K. 等, ダイアベーツ(Diabetes), 1991, 40, p. 842)、RIN細胞(チック(Chick, W.L. 等, PNAS, 1977, 74, pp. 628-632)、ATT細胞(ヒューズ(Hughes, S.D. 等, PNAS USA, 1992, 89, pp. 688-692)、CHO細胞(マツモト(Matsumoto, M. 等, PNAS USA, 1990, 87, pp. 9133-9137)および β -TC-3細胞(タル(Tal, M. 等, Molec. and Cell Biol., 1992, 12, pp. 422-432)等を包含する。また、当業者には周知の広範囲の技術を利用して組み換え細胞または細胞系を操作して、新規な生成物または機能も

しくはその組み合わせを得ることができる。

例えば、繊維芽細胞を選択された生成物（例えば、神経成長因子、エリスロポエチン、インシュリン、または第VII因子）を発現するベクターで形質転換することができる。しかしながら、あるタンパクを通常は発現しない型の細胞内での組み換えタンパクの発現は、幾つかの医学的用途には望ましくない調節されない発現に導く可能性があることを認識しておくべきである。

選択されたモノクローナル抗体を分泌するB-細胞ハイブリドーマまたは選択されたリンホカインを分泌するT-細胞ハイブリドーマを使用できる。モノクローナル抗体またはその部分を放出するものであることが特に好ましく、これらは本発明の利用により調節されない生物学的な応答変異因子の生物学的活性を中和する。これらの生物学的応答の変異因子に対するレセプタの可溶性フラグメントを分泌する操作された細胞を同様な様式で利用できる。特定の生物学的応答変異因子の無調節または過度の生産は幾つかの癌の病因に関連している。

免疫遮断すべき細胞がインビトロでの成長に適した複製を起こす細胞または細胞系である場合、これら細胞の細胞銀行を作ることが特に有利である。細胞銀行の特別な利点は、これが細胞の同一の培養物またはバッチから調製された細胞株であることにあり、即ち、同一の細胞由来の全ての細胞は同一の条件並びにストレスに暴露されている。従って、これらのパイアルは同一のクローンとして取り扱うことができる。移植に関連して、この細胞銀行は同一のまたは補充用の免疫遮断性ビークルの生産を大幅に簡略化する。これは、また移植した細胞がレトロウイルス等を含まないかどうかを確認するテストプロトコルを簡単にする。同様にこれはインビボおよびインビトロ両者により平行してビークルを監視して、インビボでの滞留に固有の効果またはファクタを調べることを可能とする。

全ての場合において、該ビークル中に含まれる細胞または組織が汚染もしくは不純化されていないことが重要である。マトリックスコアを有するビークルが望ましい場合には、適当量の生体適合性でゲル化可能なヒドロゲルマトリックス先駆体と該細胞とを無菌条件下で混合する。本発明の生体適合性かつ免疫遮断性ビークルにおいて使用するのに適した多数の天然または合成ヒドロゲルが知られている。適当な天然産のヒドロゲルは植物由来のガム、例えばアルカリ金属アルギ

ン酸塩およびアガロースおよび他の植物由来の物質、例えばセルロースおよびその誘導体（例えば、メチルセルロース）を包含する。動物組織由来のヒドロゲル、例えばゼラチンも有用である。また、コアマトリックスはクラインマン(Kleinman)等のU.S.P.No. 4,829,000(1989)に記載されているように細胞外マトリックス(ECM)成分から作成できる。適当なヒドロゲルはポリビニルアルコール、エチレン-ビニルアルコールブロックコポリマー、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム、ビニル-メチルトリペンジルアンモニウムクロリドおよびポリホスファゼン(polyphosphazene: コーエン(Cohen), S. 等, J. Anal. Chem. Soc., 1990, 112, pp. 7832-7833)を包含する。

二元マトリックス免疫遮断性ビークルを形成する場合、その包囲領域または周辺領域は上に列挙したマトリックス先駆体から選択されたヒドロゲルから作成できる。該ビークルの該包囲または周辺領域が選択透過性膜を含む場合には、他の先駆体材料を使用できる。例えば、該包囲または周辺領域は水-不溶性、生体適合性熱可塑性プラスチックポリマーまたはコポリマーで作成できる。ミカエルズ(Michaels)のU.S.P. No. 3,615,024(1971)(これを本発明の参考文献とする)により教示されたポリマーまたはコポリマーの幾つかが上記の基準を満足する。好ましい注射成型形成物は、水-混和性溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO)中に溶解したポリアクリロニトリル-ポリビニルクロリド(PAN/PVC)コポリマーを含む。この注型溶液は場合により完成された膜の透過特性に影響を与える親水性または疎水性の添加物を含むことができる。該PAN/PVCコポリマー用の好ましい親水性添加物はポリビニルピロリドン(PVP)である。他の適当なポリマーはポリアクリロニトリル(PAN)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリビニルジフルオライド(PVDF)、ポリエチレンオキシド、ポリオレフィン（例えば、ポリイソブチレンまたはポリプロピレン）、ポリスルホン類、およびセルロース誘導体（例えば、酢酸セルロースまたは硫酸セルロース）を含む。これらのおよび他の適当なポリマーまたはコポリマー用の相溶性で水-混和性の溶媒はU.S.P. No. 3,615,024に記載されている。

好ましい態様において、該コアは外層層から外側に向かって突出した細胞を含まない生体適合性ヒドロゲルマトリックスにより包囲されている。本発明のマク

ロカプセルは、リャー、リムおよびサン(Rha, Lim and Sun)のマイクロカプセル(Rha, C.K.等のU.S.P. No. 4,744,933; Sun, A.W.の上記文献)とは、(1)該マイクロカプセルの外層層を完全に排除した点、および(2)該マイクロカプセルの該外層の厚みの点で区別される。これら2つの特徴両者は本発明においてカプセル化された細胞の免疫遮断性に寄与している。リャーのマイクロカプセルはイオン性コア溶液と反対電荷のイオン性ポリマーとの相互作用により形成された。リムおよびサンはマイクロカプセルは外部ヒドロゲルジャケットとコアとをポリレリジン(PLL)の中間層を介して結合することにより形成された。

リムおよびサンはマイクロカプセルにおいて、該中間のPLL層は、カプセル化された細胞部分が該層を介して透過しないことを保証するのに十分な厚みをもっていない。このPLL層を通り抜ける細胞は免疫応答に対する有力なターゲットである。リャーの開示したカプセルを含めたこれらカプセル全ては以下のような付随的な制限をもち、即ち、(a)これらは丸く、かつ(b)その外層の形成が内部層またはコア材料との直接的なイオン結合またはポリアミド結合に依存している。丸い形状およびポリマー間の直接的イオン結合の欠点は既に述べた通りである。

リャー、リムおよびサンはマイクロカプセルは、本発明のマクロカプセルよりも高い生体適合性、繊維成長およびビークル劣化性を有している。様々な生物学的系がマイクロカプセルの集積性に必要とされるイオン結合と相互作用もしくはこれを破壊することが知られている。PLLは該カプセルと望みしからの組織反応性を引き起こす。最も顕著なものは繊維症応答である。従って、外部層の破壊がある場合、十分な厚みをもたない場合、該PLL層が分解し始める場合、またはカプセル化された細胞がその外表面にかなり近接した外部層内に取り込まれた場合には、該マイクロカプセルは繊維症応答の起爆剤となる可能性がある。本明細書で使用する用語「繊維形成誘導性(fibrogenic)」とは、移植サイトにおける繊維症応答を誘発するカプセルまたは材料を意味する。本明細書に示した如く、本発明の免疫遮断性かつ非-繊維形成誘導性のマクロカプセルの外部ジャケットは幾つかの方法により形成できる。

1 態様においては、ヒドロゲルマトリックスと架橋剤、好ましくはカルシウム

等の多価カチオンとを架橋することにより、該コアを予備形成する。しかしながら、他の公知のヒドロゲル架橋剤も使用できる。架橋後に、該コアをヒドロゲル溶液に浸漬して、該コア中の細胞を含まない第二層を形成し、該第二層を同時にまたはその後好ましくは同じ方法で架橋する。本態様において、該コア材料と該ジャケット材料との架橋は架橋剤により達成される。例えば、該コアおよびジャケット材料両者が負に帯電したヒドロゲルである場合、該コアおよびジャケットは該架橋剤、好ましくはカルシウム上の正電荷に相互に引きつけられることにより互に架橋される。該コアおよびジャケットは同一のまたは異種のヒドロゲルから形成可能であるが、これら両者は同一の電荷をもつ必要がある。特に、本発明のビークルは、U.S.P. No. 4,744,933(リャー(Rha), CX 等, 1988年5月17日)に記載されたようなアニオン性およびカチオン性ポリマー間の直接的なイオン結合により形成されたものではない。ここで、「直接的なイオン結合(direct ionic bonding)」とは2種の逆符号に帯電したポリマーが該逆符号の帯電部分により相互に吸引される型の化学結合を意味する。本態様はリャーのものとは区別される。というのは、本態様においては、該コア材料および該ジャケット材料両者が同一の電荷を有しており、かつこれらは逆符号に帯電した架橋剤を介して結合しているからである。本態様はマイクロカプセルまたはマクロカプセル形状であり得るが、本明細書に述べた理由からマクロカプセル形状が好ましい。

本発明のビークルは同時押し出し法または段階的組み立て法の何れかによって形成し得る。本発明のビークルの形成に使用できる同時押し出し技術は1990年1月8日付で出願された該発中の米国特許出願No. 07/461,999に教示されている。これを本発明の参考文献とする。例えば、U.S.S.N. 07/461,999に教示されているものと同一の同時押し出し装置を本発明のビークルの製造に使用できる。この装置は、無状の孔をもつ押し出しノズルを有し、各孔（内部および外部）の内腔は該コアおよび包囲領域材料の放出のために貫通チャンバーに適当に接続されている。該ノズルは、固定化すべき細胞の代謝要件、および包囲されるマトリックスの透過性および強度に適した形状の免疫遮断性ビークルを作成するのに適した任意の形状をもつことができる。例えば、該ノズルは円形、楕円形、星型、またはスロット型であり得る。場合によっては、該無状の孔は両腔状であってよい。該ノズ

ルの最大の開口は、形成されるビークル、隔離された細胞または組織の代謝要件並びに該コアおよび周辺領域の材料に達した最大拡散率と比例するものである必要がある。該内部および外部チャンバーから、対応するノズルの孔を通して、該包囲または周辺領域（および該コア領域）のマトリックスまたは親先駆体をゲル化し、硬化し、かつ注型するのに十分な条件下で、該コア並びに周辺領域用の材料を押し出す際には、選択された形状の長いビークルが連続的に形成される。該ビークルの長さおよびその結果としてのその体積または容量は意図した適当な用途に適したサイズのビークルを生成するように制御できる。このような同時押し出しにより形成される免疫遮断性ビークルが特に好ましい。というのは、この手段の利用により、該コア内の細胞が該ビークルの形成時点から確実に隔離されることになるからである。従って、移植前の該ビークルの取扱い中の該コア材料の汚染もしくは不純化が確実に防止される。更に、この同時押し出し法の特徴は、この方法が該包囲または周辺領域（ジャケット）が細胞を含む該コア内の物質を全く含まないことを保証し、結果として該ビークルを個体内に移植した場合にこれら細胞が免疫遮断されるであろうことを保証していることにある。該包囲または周辺領域の透過性、分子重量遮断、および生体適合性は、選択され使用されたマトリックスまたは親先駆体材料および該マトリックスまたは膜を形成する条件両者によって決定される。

この同時押し出されたビークルは、ヒドロゲルマトリックスと熱可塑性プラスチックまたはヒドロゲルジャケットとを含むように形成できる。かかるマクロカプセルは、相互に架橋し得るまたは架橋し得ない同一のまたは異なったヒドロゲル製のジャケットを有するように形成できる。

本発明の膜またはゲルの選択透過性に関連して、用語「分子重量遮断値(molecular weight cutoff)」（MWCO）を使用する。選択透過性膜の分子重量遮断値を測定するために利用できる多くの方法があることは公知である。使用した方法に応じて、同一の膜に対して幾分異なるMWCO評価値が得られる可能性がある。本発明においては、MWCOとは特定の測定条件の下で記載された特定のマーカーを使用して本明細書に記載の経験的に測定した結果を意味する。本発明に適用されるMWCOを測定する他の方法では、当業者には公知の方法に従って本発明のプロトコールに対し

されている場合には、滑らかな外面が形成される。

この免疫遮断性ビークルは、また段階的な様式で製造することもできる。該コアが隔離しようとする細胞の他に、ヒドロゲルマトリックスを含むビークルに対しては、該コアを先ず形成し、次いで包囲または周辺マトリックスまたは膜を組み込むか適用することが可能である。該マトリックスコアは押し出しまたは成形により形成できる。好ましい態様においては、パッチまたはシート状のビークルをカレンダー掛けしたシートの段階的押し出しにより形成する。この態様において、コア材料のシートを周辺領域材料のシート上に層状に載せ、次いで周辺領域材料の第二のシートにより覆う。次に、該ビークルの端部をクリップ加工、圧縮、加熱、生体適合性接着剤による封止、または予備成形した生体適合性かつ不透過性のクリップによる接合あるいはこれらの組み合わせ等によって封止する。

逆に、該包囲または周辺マトリックスまたは膜を予備成形し、該コアを形成する材料で満たし（例えば、注射器を使用して）、次いで該コア材料が完全に包囲されるように封止する。該コア中にマトリックス先駆体材料が存在する場合は、このビークルを次にコアマトリックスの形成をもたらすような条件に暴露する。あるいは、パッチまたはシート状マトリックスコアを成形により形成し、次いで選択透過性のシート間に挟み、上記のような方法で封止またはクリップ留めして該コア材料の隔離を完成する。

免疫遮断および支持または固定化両者を単一の連続なヒドロゲルマトリックスにより生成することも可能である。例えば、ビークルの周辺領域が固定化された細胞を含まないように、該ビークル内にコアの回りに同心状の勾配で分布するように隔離細胞を含めることにより達成し得る。この性質をもつ免疫遮断性ビークルは少なくとも2つの方法により作成し得る。その1つによれば、隔離された細胞よりも高密度のヒドロゲルマトリックス先駆体溶液中に懸濁された細胞混合物を単一の押し出し装置のノズルから押し出すことができる。この際にして、該細胞を形成中のビークルのコア領域に強制的に入れる。あるいは、該細胞-マトリックス先駆体混合物を鼠状の孔をもつノズルのコア内腔(core lumen)から押し出し、一方同時にゲル化剤（例えば、アルギン酸塩に対しては塩化カルシウムの溶液）の塊を周辺ノズルを通して放出して、該ビークルの表面および周辺を先ず重合

てキャプリレーションする必要がある。

二元マトリックス免疫遮断性ビークル（例えば、アルギン酸塩マトリックス）を形成する場合、包囲マトリックスの透過性は使用するマトリックス先駆体（例えば、アルギン酸ナトリウム）の濃度および／または該材料が同時押し出される浸漬浴中に存在するゲル化剤（アルギン酸塩の場合は、2価のカチオン、例えばCa⁺⁺）の濃度を調節することにより決定し得る。

熱可塑性プラスチック製の包囲または周辺領域をもつビークルが所望の場合、孔径範囲および分布は該先駆体物質溶液（注型溶液）の固形分含有率（場合により、U.S.P. No. 3,615,024に指示されたような、該注型溶液に添加された親水性または疎水性添加物を含む）、水-混和性溶液の化学的組成を変更することにより調節できる。この孔径は、また凝固剤および／または該浴の疎水性を変えることにより調節できる。典型的には、この注型溶液は溶解した水-不溶性のポリマーまたはコポリマーを含む極性有機溶媒を含有する。このポリマーまたはコポリマーは溶媒-混和性の水性相と接した場合に沈殿して、界面部分に選択透過性の膜を形成する。この膜の孔径は該水性相の該溶媒相への拡散速度に依存して変動し、該親水性または疎水性の添加剤はこの拡散速度を変えることを通じて孔径に影響を及ぼす。該水性相が更に該溶媒相に拡散するにつれて、該ポリマーまたはコポリマーの残りの部分は沈殿して、最終的なビークルに機械的強度を付与する柱状の(trabecular)支持体を形成する。このビークルの外部表面も、同様に該溶解したポリマーまたはコポリマーが沈殿する条件（即ち、連続気流型の柱状またはスポンジ状の外部スキンを形成する空気への暴露、滑らかな選択透過性の2層膜を生成する水性沈殿浴への浸漬、または中間的構造の膜を形成する水蒸気と飽和された空気への暴露）により調節し得る。また、この免疫遮断性ビークルの形成法は、該ビークルを移植する個体の免疫系から隔離しようとする該コア内の細胞を包囲または周辺領域が全く含まないことを保証していることが容易に理解されよう。

該ビークルの表面組織は一部には該押し出しノズルが該浴の上方にあるかまたはその中に浸漬されているかに依存し、該ノズルが該浴の上方に配置されている場合には、PAN/PVCの粗い外部スキンが形成され、一方で該ノズルが該浴中に浸漬

し、かくして堅固な細胞を強制的に該コア内に入れることも可能である。

本発明の優れた応用の1つにおいて、上記の如く単位体積当たりの高い充填率に適した形状に天然の細胞クラスターを再配置させることにより、該細胞を形成することでもできる。

好ましくは、このようにして再配置されたクラスターは、天然の細胞クラスターに比して、該クラスター内の細胞からのおよび該細胞への必須の溶質の改良された拡散性によって特徴付けられる。

ここに記載の方法の何れかにより得られた、新たに形成された免疫遮断性ビークルは、移植前に、発熱性物質を含まず、血清を含まないことが確認された栄養増地または均相増殖液中で、約37℃にて無菌条件下に維持できる。幾つかの型の細胞および／または培養条件に対してはより低温度（20〜37℃）が最適温度である場合もある。良好な細胞の生存性を保証する他の維持温度および増殖組成も使用できる。また、このビークルは、低温保存剤例えばグリセリンを該マトリックス中に配合した場合には、液体窒素中で低温保存可能である（ラジョット(Rajotte), R.V. 等, トランスプランテーションプロシーディングズ(Transplantation Proceedings), 1989, 21, pp. 2638-2640)。このような場合には、該ビークルは使用前に解凍し、上記のような無菌条件下で平衡化させる。

該生体適合性で免疫遮断性のビークルの移植も無菌条件下で実施する。一般的に、この免疫遮断性ビークルはレシビエントの体内のサイトに移植され、該サイトは分泌物の適当な放出または該レシビエントへの機能の付与を、および該移植細胞または組織への栄養分の放出を可能とし、かつ該ビークルの回収および／または交換をも可能とする。該ビークル内に固定化された該細胞が移植前後において適当に機能しているかどうかを確認することが好ましいと思われる。この目的のために当分野で周知のアッセイまたは診断テストを利用できる。例えば、ELISA(酵素結合イムノソルベントアッセイ)、クロマトグラフィーまたは酵素アッセイ、または分泌された生成物に対して特異的なバイオアッセイを使用できる。必要ならば、インプラントの分泌機能を、レシビエントから適当な試料（例えば、血清）を採取し、これをアッセイすることにより一定時間中監視することも可能である。

本発明を以下の実施例により更に詳しく説明するが、これら実施例は本発明を何等制限するものではない。

実施例1：免疫遮断用の細胞の調製

細胞系または一次源由来の細胞を、免疫遮断前にインビトロで維持した（幾つかの場合においては、細胞は低温保存し、次いで解凍して、インビトロで飼育することが可能である）。インキュベーター条件は特定の細胞系毎に変化するが、当業者は日常の実験程度で容易に確認できるであろう。ランゲルハンスの島細胞をシャープ(Scharp)等の上記文献に記載の方法により得、血清（例えば、25% v/v のブールしたウマドナー血清）を補充した栄養ブロス（例えば、ハムSF12、ギブコ(GIBCO) 社製）を含む培地中で5% CO₂-95%空気なる雰囲気内で37℃に維持した。島細胞をベトリ皿を使用して24℃にて所定時間の間、レーシー(Lacy), P.E. 等の方法（サイエンス(Science), 1979, 204, pp. 312-313）に従って培地中に維持した。免疫遮断の前に、この島細胞を集め、ベトリ皿を攪拌することにより濃縮し、ハンスの均衡塩溶液(HBSS)に再懸濁した。洗浄したこの島細胞を十分な体積のHBSSに再懸濁して、所定の数の島細胞を含み、移植およびその後の糖尿病動物に正常血糖値を回復させるのに適したサイズおよび形状をもつ免疫遮断性ビークルを形成するのに必要とされる最終島細胞密度を得た。免疫遮断前の該細胞の調製方法は、該島組織から抗原性を示す細胞を除去し、かくしてビークルの機能並びに耐久性を制限する可能性のある該ビークルの外部への免疫学的な誘引を減らすものであると考えられる。

実施例2：種々の分子量遮断値を有するヒドロゲルマトリックスの形成

1.0%(w/v) のアルギン酸ナトリウム水性溶液から作成したアルギン酸塩の薄膜を、6分間に渡り(1) 1.0%(w/v) または(2) 2.0%(w/v) のCaCl₂ 水性溶液を使用して架橋した。クリアランス0.2 mmの引箔ブレードを用いてガラスプレート上に膜状フィルムを形成することによりシートを作成し、次いで該CaCl₂ 水性溶液中に浸漬した。47mmの切断ダイを使用してこのフィルムから円盤を切り取った。この円盤をアミコン(Amicon)製の攪拌濾過セルに取付け、10 psiの圧力下で数種のマーカー溶液の溶液を濾過するのに使用した。該マーカー溶液の濃度は保持物質中で測定し(C₀ = 初期および最終の保持物質の濃度の平均値)、また同様にバルクドパーミエート(bulked permeate) 中でも測定した(C_f)。各ヒドロゲルの

忌避係数(rejection coefficient) を以下の如く算出した。

$$R = 1 - C_f / C_0$$

かくして、完全に忌避される溶質は係数1を有し、逆に完全に該ヒドロゲルを通過する溶質は係数0を有するであろう。上記(1) から得られるヒドロゲルは2,000 kDのデキストラン（ポリサイエンス社(Poly Sciences corp)）まで透過性であった（忌避係数は0.64）。また、上記(2) から得られるヒドロゲルは同一のデキストラン溶液に対して殆ど不透過性であった。第1図は以下の付随的溶質：即ちウシ血清アルブミン(BSA; ICN バイオケミカル(Biochemicals)社製)、 α -キモトリプシン(ICNバイオケミカル社製)、アポフェリチン（シグマ(Sigma) 社製）の2種のヒドロゲルに対する透過性を図示したものである。およその分子量を該図の括弧内に与えてある。

実施例3：二元マトリックス免疫遮断性ビークルの形成

生理塩水 (PS; 150 mMNaCl) に溶解したアルギン酸ナトリウムの2%溶液を無菌条件下で調製した。成熟ラットから単離した群島細胞をCRML1066培地（ギブコ(GIBCO) 製）に懸濁した無菌懸濁液を該アルギン酸溶液で1:1 に希釈し、該島細胞懸濁液中のアルギン酸塩の最終濃度を1%とした。この島細胞懸濁液を単一チャンパー押出しノズルから1%CaCl₂ 浴中に押し出した。一旦該アルギン酸多価イオンを架橋し（約2分）、固定化した島細胞を含むコアを形成した後、該コアを2%アルギン酸溶液に入れた。次いで、このコアよりも約500 μ 大きな径のチューブに圧伸成形し、このコアを更に2%アルギン酸塩を含む第二の架橋浴中に再押し出して、該コアに架橋されたアルギン酸塩マトリックスの別の細胞を含まない層で形成したジャケットで包囲した。かくして形成したマクロカプセルは長さ30mm、コア径800 μ mおよびコアからジャケットまでの距離1 mmの円筒状であった。該コアの体積は15mm³であった。このコアは300 個の島細胞を含み、その体積分率は全コア体積の10.6%であった。

実施例4：同時押し出しによる二元マトリックス免疫遮断性ビークルの形成

生理塩水 (PS; 150 mMNaCl) に溶解したアルギン酸ナトリウムの2%溶液を無菌

条件下で調製した。成熟ラットから単離した群島細胞をCRML1066培地に懸濁した無菌懸濁液を該アルギン酸溶液で1:1 に希釈し、該島細胞懸濁液中のアルギン酸塩の最終濃度を1%とした。

この島細胞懸濁液を前に記載した構造的な二重孔同時押し出しデバイスの内部チャンパーに装入した。該デバイスの内部孔の径は500 μ であり、またその周辺孔の径は600 μ であった。このデバイスの外部チャンパーにはPS中に溶解したアルギン酸ナトリウムの1%無菌溶液を装入した。

該ノズルの先端を、PS中に1%のCaCl₂ を含む無菌溶液を含む浴中に浸漬した。該浴はアルギン酸塩多価イオンの架橋により該アルギン酸塩の硬化またはゲル化を誘発する。これらチャンパーに装入した物質をこの浴内に同時押し出し、アルギン酸塩マトリックス-固定化島細胞のコア領域と島細胞を含まないアルギン酸塩マトリックスの包囲領域とを含むアルギン酸塩の円筒の連続的に形成した。該ジャケットの外径は1.2 mmであった。該コアの内径は1.0-1.05mmであった。該コアの全島細胞体積は0.8mm³(200島細胞)であった。全コア体積は25.98mm³であった。該島細胞の体積は全コア体積の3%であった。1%アルギン酸塩のMWCOを第1図に示した。しかしながら、このMWCOは、連続的なCa⁺⁺交換のために、第7図と同様に時間の経過に伴って増加するであろう。該コアのアルギン酸塩は該ジャケットのアルギン酸塩により架橋されていた。

包囲領域の相対的な厚みを、該ノズルのコアおよび周辺孔から押し出される該材料の速度を調節することにより変えた。一般的に、該コア内の流量が増大するにつれて、壁の厚みは減少した。周辺孔の流量が増大すると、壁の厚みも増大した。使用する流量の範囲は該コアおよび周辺孔に対して同一にした（0.3-1.5ml/分）。該円筒を、先ず無菌の2%アルギン酸ナトリウム浴に、次いで無菌1%CaCl₂ 浴に浸漬することにより該円筒の末端を封止した。かくして形成した免疫遮断性ビークルを移植前に該島組織培養培地中に維持した。

実施例5：同時押し出しによるコアマトリックス、選択透過性膜免疫遮断性ビークルの形成

実施例3に記載した如く1%アルギン酸溶液中に懸濁したラット島細胞懸濁液

を調整し、上記の同時押し出しデバイスの内部チャンパーに装入した。DMSO (即ちジメチルスルホキシド) 中に12.5%(w/w)のPAN/PVC を含有する懸注型溶液をその外部チャンパーに装入した。ノズルの先端を、PS中に1%のCaCl₂を含む無菌溶液を充填した浴上方の一定距離の位置に配置もしくは該浴中に浸漬した。該1%のCaCl₂を含む無菌溶液は該アルギン酸塩コアマトリックスを硬化またはゲル化し、同時に該注型溶液の選択透過性膜への硬化を誘発した。このビークルの外表面特性は該ノズルが該浴表面の上方または下方に位置するか否かにより決定された。このノズルを該浴の上方に配置し、かつ低相対湿度(RH)の空気に暴露した場合には、粗い、革のようなく(即ち、レザー状の)外表面をもつ異方性の膜を形成し、一方で該ノズルを浴中に浸漬した場合には、滑らかな外表面をもつ二層膜が形成された。また、ノズルを浴上方に配置し、かつ繊維を高RH空気に暴露した場合には中間的な膜が形成された。該チャンパーに装入された材料をこの浴中に同時押し出して、円筒状のビークルを連続的に形成した。このビークルはアルギン酸塩マトリックス-固定化鳥細胞のコア領域と周辺のMWCO 50 kDをもつ半透膜を含んでいた。

この膜の相対的な厚みを、実施例3に記載したように、該孔からの相対的押し出し速度を調節することにより変えた。該円筒の先端を、1990年1月8日付けで出願された特許出願07/461,999号に記載の方法を使用して封止した。該米国特許出願の教示を本発明の参考とする。かくして生成した免疫遮断性ビークルは、移植まで無菌PS、均質化培養液または組織培養培地中に維持した。

実施例6:「手作業での充填」によるコアマトリックス、選択透過性膜免疫遮断性ビークルの形成

他の場合においては、該鳥細胞を1-2%アルギン酸塩溶液中に懸濁し、注射器を使用した「手作業での充填(hand loading)」により、予備成形した熱可塑性プラスチック中空繊維内に充填し、該繊維の先端を該溶液中のU.S.S.N. 07/461,999に記載の方法で加熱とポリマー接着剤析出との組み合わせにより封止した。この熱可塑性プラスチックジャケットのMWCOは約50kDであった。該ヒドロゲルマトリックスは、該充填繊維を1%塩化カルシウム溶液中で8分間インキュベートすることに

より形成した。

実施例7:固定化され、免疫遮断された鳥細胞のインビトロでの生存率および機能の評価

実施例3および6に記載の方法により成熟ラット鳥細胞を二元マトリックスビークル内に免疫遮断した。熱可塑性プラスチックジャケットを備えたマトリックス形状コアビークルを少なくとも2週間インビトロでインキュベートした。このビークルは上部に厚み65 μ mの壁をもち、コア外径は800 μ mであった。アルギン酸塩/アルギン酸塩二元マトリックスビークルはコア径880 μ mおよび壁厚60 μ mを有していた。インキュベーターは25%のウマ血清を補充したハムスF12培地中に浸漬し、37℃にて5%CO₂-95%空気雰囲気内で実施した。該培地は3日または4日毎に新鮮なものと交換した。

プロピジウム(propidium)アイオタイドを使用して、この免疫遮断した鳥細胞は、このインビトロでのインキュベーション期間の経過後95%が生存性であることが分かった。これらは、また機能性をも維持していた。グルコースを使用した灌流テストを実施した場合(ジョン(Dionne)の上記文献)、免疫遮断した鳥細胞は強度およびパターン両者において、同様な条件下で同一の期間に渡りインビトロでインキュベートした未処理の鳥細胞と同一のインシュリン分泌応答をもつことを示した。インシュリンの遊離はソールドナー(Soeldner), J.S.等, ダイアベーツ(Diabetes), 1965, 19, p. 771の方法に従って測定した。典型的な灌流実験の結果を第24図および第28図に示した。使用したグルコースの刺激(challenge)およびベースライン濃度はそれぞれ300mg%および100mg%であった。グルコース刺激に伴うインシュリン遊離の第1相の開始またはベースライン分泌への回復の何れにおいても免疫遮断された鳥細胞には有意な遅れは観察されなかった。更に、未処理の鳥細胞のものに匹敵する第二相の上昇が見られた。鳥細胞当たりで表示すると、免疫遮断された鳥細胞により遊離されるインシュリンの量は未処理の鳥細胞の値と同様であった。これらの結果を第34図および第38図にまとめた。

実施例8:内部ヒドロゲルマトリックスをもつまたはもたない熱可塑性プラスチック

かにした。この鳥細胞を組織の大きな塊にまで濃縮したところ、その中心部分で重度の壊死が見られ、僅かに縁部分でのみ生きたかつ同定可能な鳥細胞として生き残っていた。従って、鳥細胞の腐敗を防止し、結果として細胞の死滅を防止するためのマトリックスの存在は細胞の生存性を大幅に改善し、結果として該インプラントの長期に渡る有効性をもたらす。

実施例9:免疫グロブリン透過性ビークル内に免疫遮断された調和異種移植鳥細胞の移植による、ストレプトゾトシン-誘発糖尿病マウスにおける正常血糖値への回復率の評価

二元マトリックス免疫遮断性ビークルのインビロ性能を、ストレプトゾトシン-誘発糖尿病マウスにおける正常血糖値への回復率について、ラット-マウス調和異種移植モデルを使用して評価した。このビークルは実施例3に記載した如くして調整され、2,000 kDのデキストリンの高い透過性を有していた(第1図)。従って、これらのビークルはIgG(150kD)に対して高透過性であった。この実験の結果を第2にまとめる。動物を3群に分けた。即ち、群1は動物1匹当たり300個の非免疫遮断鳥細胞を腎臓下のサイトに移植した7匹のコントロール動物からなる。これら動物の僅かに1匹のみが12日以上に及ぶ高血糖症の改善を示した。群1における平均の正常血糖値持続期間は14.0 \pm 3.1日であった。

群2は13匹の動物からなり、その各々は周辺の細胞を含まない領域をもたないアルギン酸塩マトリックス中に固定した300個のラット鳥細胞を移植した。移植片はこれら群2の動物中8/13で24日以内に失われ、このことは単なる固定はコントロール群1を越える利点をもたないことを示している。残りの5匹の動物は移植片を除去するまで正常血糖値を維持した。群2における正常血糖値の平均持続期間は29.3 \pm 5.5日であった。

群3は10匹の動物からなり、その各々には実施例3に記載した構成の、即ち細胞を含まないアルギン酸塩マトリックスの周辺層をもつ二元マトリックス免疫遮断性ビークル内に固定化したラット鳥細胞300個を移植した。これら動物の僅かに4匹のみが移植後14日以内にその移植片機能を喪失した。しかしながら、6匹の動物は、実験を停止し、該移植片を取り出した移植後100日目に至っても正常

バック膜を有するビークル内に隔離された異種移植した鳥細胞の性能のインビロでの比較

ラットの鳥細胞を実施例6に記載の如くマトリックスまたは形状コア熱可塑性プラスチックビークル内に免疫遮断した。ビークルの寸法は外径(O.D.)800 μ m、壁厚55 μ m、および繊維長さ2cmであった。約20%充填密度を使用した。形状コアパセルの場合、アルギン酸塩は該細胞懸濁液中に含めなかった。第一の実験において、鳥細胞はマトリックス内に免疫遮断した。調和異種移植(即ち、近接した関連性をもつ種間)のためにストレプトゾトシン-誘発糖尿病マウスの腹腔内にビークルを移植した。自由-浮遊インプラントを腹腔内に挿入した。8匹の動物に各々500-1000個の免疫遮断したラット鳥細胞を移植した。1匹の動物は高血糖症の改善を何等示さなかった。他の動物は、移植後5日以内に正常血糖状態に復帰し(即ち、これら動物の血漿中グルコース濃度が100-125mg%と規定されている正常な範囲に復帰し)、該移植片を除去した60日後まで正常血糖値を維持し、該移植片の除去後該動物は再度高血糖症となった。7回のかかる実験の平均した結果を第4図に示した。これら動物中における血漿中グルコース濃度には大きな揺らぎがないことに注目すべきである。回収された免疫遮断性ビークルを組織培養の過度の成長の有無につき検査し、グルコースの灌流に反応するインシュリンの遊離能力を評価した。該ビークルの何れも繊維芽細胞で完全に包封されていたが、後つかの領域においては該ビークル外部の回りに3-5層の繊維芽細胞層を有することが観察された。回収された免疫遮断性ビークルはグルコースおよびテオフィリン刺激に反応して、灌流した際にインビトロでインシュリンを遊離し、またその組織学的解析により、 β 細胞内におけるインシュリン染色が存在することから生きた鳥細胞の存在が明らかとなった。グルコースおよびテオフィリン刺激を利用した灌流実験の結果を第5図に示した。

これらの好ましい結果は、ラット鳥細胞を固定化マトリックスを使用しないPAN/PVC膜内に免疫遮断した場合に観察される結果と鮮明な対照を示した。これらの免疫遮断性ビークルについては、移植後僅かに12 \pm 3日間機能の応答性を示したにすぎなかった。テストした5匹の動物中5匹がその後に高血糖状態に復帰した。これらの免疫遮断性ビークルの組織学的研究は該鳥細胞の腐敗の存在を明ら

血糖値を維持した。また、該移植片の除去後急速に糖尿病状態に復帰した(第6図)。群3の動物の正常血糖値の平均持続期間は 65.8 ± 15.1 日($n = 10$)であった。回収したアルギン酸ビークルに関する組織適合性の反応は最小限度内であった。この回収した免疫遮断した島細胞の組織学的解析により、 β 細胞内におけるインシュリン染色が存在することから生きた島細胞の存在が明らかとなった。本実施例で使用した免疫遮断性ビークルは、また高分子量タンパク、タンパク免疫グロブリンG等のタンパクに対して透過性であるビークルの機能性並びに生体適合性をも立証した。

表1: 糖尿病マウス中の免疫遮断された異種移植片の生存性

群	ビークル	生存率(日)	
		個々の生存率	群の平均
1	コントロール	7, 12, 12, 12, 12, 12, 29	14.0 ± 3.1
2	固定化	8, 12, 12, 14, 15, 16, 18, 24, 41*, 53*, 54*, 58*, 60*	29.3 ± 5.5
3	免疫遮断	8, 8, 12, 13, 102*, 102*, 102*, 102*, 104*, 104*	$>65.8 \pm 15.1$

*: 島細胞移植片の除去のために腎摘出。

実施例3に記載の構成を有するビークルを調製した。これは数千個の島細胞を含み、かつ50kD未満の膜MNCOを有していた。

このビークルを糖尿病BBラットに移植した。このラット種はヒトタイプ1自己免疫糖尿病の複製実験のための嚮導目モデルとして公知である。このビークルをインビトロでの21日間の滞留期間の経過後に回収した。該免疫遮断した島細胞は、

トとした。生成したベレットを、1000島細胞当たり5 mlの同一の培地中に再度懸濁した。このスラリーを、手で支持したマイクロベレットを使用して20℃にて8分間攪拌した。8分間の経過後に、トリプシンとDNアーゼとを最終濃度がそれぞれ $25 \mu\text{g/ml}$ および $2 \mu\text{g/ml}$ となるまで添加した。このスラリーを約5分間攪拌し、マイクロベレット処理することにより更に濃縮し、この時点での顕微鏡観察は最大の懸集体が約50細胞程度からなることを示した。1000個の島細胞当たり10%の新生児ウシ血清を含む冷DHEMを10ml添加することにより、この消化を停止させた。250xgにて6分間遠心処理することにより懸集体をベレット化した。懸集体を25%のウシ血清を含むハムスF12中で一夜培養し、その間時間限定された再懸集が起こり、約30 μm の体積基準の平均懸集体サイズを与えた。

一夜の培養に引き続き、250xgにて6分間遠心処理することにより懸集体をベレット化した。凍結していない2%のアルギン酸塩溶液を該ベレットに添加して、1%のアルギン酸塩と8%の組織(W/V)とを含む溶液を得た。このコアの最終的な島細胞体積は、均一に該凝固媒体全体に渡り分散された懸集体として、0.56 mlであった。この組織スラリーをPe 90 チューブのある長さまで無菌条件下で吸引した。該チューブの端部は、中空繊維膜の内径670 μm (外径は800 μm)の内腔に適合するように予め細くしておいた。組織含有スラリー10 μl を、2 cmの長さの段つかのPAN/PVC 繊維の各々に注入した。各繊維の端部は上記の如く封止し、該繊維を25%のウマ血清を含むハムスF12中で一夜保存した。移植する前に、繊維を血清を含まない新鮮なハムス培地中に1時間入れておき、残留血清を除去した。

一夜の培養後、該ビークルの半分を正常血糖値を有するラットの腹腔内に移植し、かつその半分をインビトロでの組織培養状態に維持した。2週間後に移植したビークルを該腹腔内から取り出し、インビトロで培養したコントロールビークルと共に、インビトロでのグルコース刺激に付した。外植ビークルは移植前に観察されたものと同一またはそれ以上に良好なインシュリン遊離性を示した。このことは、インシュリン遊離性のみならずグルコース感受性についても機能維持されていることを示している。グルコース刺激に引き続き、該ビークルのアルギン酸コアを「取り出し(blow out)」該組織の生存性の検査のためにPIで染色し

(組織学的解析によれば)生存性であり、かつその機能を維持していることが分かった。

実施例10: 不一致異種レシビエント中に免疫遮断された島細胞の生存性の評価

固定化したラット島細胞を含む二元マトリックス免疫遮断性ビークルを、実施例4に記載した如く、星状の孔をもつノズルからの同時押し出し法によって調製した。このマトリックスのゲル化条件は2,000 kDのブルーデキストリン(第7図におけるような)に対して透過性のヒドロゲルマトリックスを生成するように選択し、かくして生成したビークルは、従って免疫グロブリンG-Clqまでに対して透過性であった。

長さ約0.5 cmのセグメントを、容易に肉眼観察できる細胞を含まない領域を形成するための該コア材料の流れを周期的に中断することにより、連続円筒状ビークルから調製した。該繊維を細胞を含まない領域で切断することにより、完全に細胞を含まないアルギン酸塩マトリックスの領域により該細胞を包囲した。これらのビークルをモルモットの隔種の家鼠(n=2)と不一致(即ち、関連性のかけ離れた)宿主との間で移植した。インビトロでの21日間の滞留期間の経過後、該ビークルを取り出して、グルコース-応答性インシュリン遊離についてインビトロでテストした。結果を第8図にまとめた。基礎的刺激に伴って、300mg/dlのグルコースで刺激した場合に、該免疫遮断した島細胞からの統計的に有意なインシュリン遊離における上昇が観察された。基本的インシュリンレベルへの復帰はグルコース濃度が100mg/dlに戻った際に生じた。アルギン酸塩コアをもつ熱可塑性プラスチックビークルは同様な結果を与えた。

実施例11: 制御された再懸集による組織生存性の改善

シャープおよびレーシー(Scharp and Lacy)のU.S.S.N. 07/059,125 および07/364,976に記載の方法に従って調製した複製イヌ島細胞を、以下のプロトコルに従って1~50細胞を含む細胞懸集体として分散させた。1000個のイヌの島細胞を1mMのEDTAを含み、Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を含まないハムス培地50mlで3回洗浄した。最後の洗浄後に、島細胞を100xgにて8分間10℃にて遠心処理して、ベレッ

た。各懸集体を一緒に延伸して、延約35 μm の緊密な球面を形成したが、個々の懸集体は該アルギン酸塩コア全体に渡り均一な分散状態を維持しており、かつ一緒にクラスター形成して壊死領域を形成することはなかった。PI染色液により染色されなかったことは、生存性が100%であることを示す。

実施例12: パーキンソン病の実験的モデルにおける、免疫遮断した副腎クロム親和性細胞の移植の際の運動性の部分的回復

ウシ副腎クロム親和性細胞を、リベット(Livett)B.G.の方法(Physiol. Rev., 1984, 64, pp. 1103-1161)により副腎臓から回収し、コラーゲナーゼ消化しおよびバクテリアまたは真菌による汚染がないことを確認するために10日間培養物中に維持した。クロム親和性細胞塊を血清を含まない培地中で遠心処理し、1%アルギン酸塩溶液に再懸濁することにより洗浄した。この細胞懸濁液を使用して、実施例4に記載の如く同時押し出しにより、マトリックス-コア、熱可塑性プラスチック製の免疫遮断性ビークルを形成した。水性比溶液は、該培地中に最終濃度0.5%でCaCl₂を含むように、1:2の比率で1%CaCl₂と組織培養培地とを混合した溶液を含んでいた。繊維を該培地中で6分間インキュベートして、該アルギン酸塩をゲル化させ、次いでドゥルベコ(Dulbecco's)改良イーグル培地(DHEM)を含むベトリヨに移した。この繊維を、良好な整形状をもつ領域について肉眼で観察し、次にクロム親和性細胞の存在につきスポット-検査した。次いで加熱、溶液の使用および加圧の組み合わせにより各部分の末端を封止することにより、これを4mmの長さの部分に分割した。

8匹のスプラーク-ダウレイ(Sprague-Dawley)ラットの黒質に、6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)を注射(10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$)した。これらをアポモルフィン(0.1mg/kg)誘発回転運動について1週間隔でテストした。このテストはウングエルシュテート(Ungerstedt)V.U., Acton. Physiol. Scand. Suppl., 1971, 367, pp. 69-93 およびウングエルシュテート(Ungerstedt)V.U., Brain Res., 1970, 24, pp. 485-493の方法により実施した。

アポモルフィンは、6-OHDA-誘発損傷例からかけ離れたパーキンソン病-様の運動障害を誘発する。アポモルフィン注入の際にかかる回転運動の程度は損

傷の程度および免疫遮断されたクロム親和性細胞により与えられる改善の程度を監視するのに使用できる。¹⁴パーキンソン病の誘発の6週間後に、該動物の線条体内に、コントロール（中空）または副腎-クロム親和性細胞-含有ビークルの何れかを移植し、再度1週間隔で回転運動につきテストした。これらの結果を第9図に示す。

移植する前に、全ての動物はアボモルフィン刺激に伴って等価な数の回転を示した。しかしながら、移植後2週間以内に、免疫遮断した副腎クロム親和性細胞を移植した動物は回転における有意の35-40%の減少を示し、これはテスト中安定に維持された。このことは、該インプラントが6-OHDA-誘発損傷の作用を有意に阻止することを示す。コントロールビークルを移植した動物は何等回転数の減少を示さなかった。

実施例13: エクシトキシンディーによる神経損傷の予防

本例は、栄養因子を分泌する細胞を含むビークルの移植による対象の神経毒性促進性による神経損傷の予防法を例示する。神経毒性促進性の動物モデルはハンチントン病に罹患した患者の該った神経損傷の型と類似するものと考えられる。

対象

90-120日齢で、体重約225-250 g の雄スブラーグーダウレイ (Sprague-Dawley) ラット (N = 23) を以下の実験で使用した。全ての動物は0700時に点灯する12時間の明/暗サイクルに保ち、温度および湿度制御したコロニー部屋で2〜3匹ずつの群で厩内飼育したものであった。飼料および水はテスト中自由に摂取させた。

副腎細胞-含有マクロカプセルの調製

ウシ副腎クロム親和性細胞を副腎臓から回収し、バクテリアまたは真菌による汚染がないことを確認するために10日間培養物中に維持した。クロム親和性細胞塊を血清を含まない培地中で遠心処理し、1%アルギン酸塩溶液に再懸濁することにより洗浄した。この細胞懸濁液を15% PAN/PVC: DMSO 溶液における同時押し出し孔溶液 (bore solution) として使用した。このクロム親和性細胞を含有する

して0.9%の塩水(50ml/分)で、次いで0.1M塩酸バッファー(4℃)中の1%パラホルムアルデヒド/1.25% グルタルアルデヒド(800ml/30分)で該動物を灌流させた。次いで、20% スクロース中に24時間維持する前に、該脳を該パラホルムアルデヒド溶液中で2時間後固定処理した。次に、該脳を凍結し、滑走ミクローム上で隔次30μmの冠状結合部分に切断した。これら部分を、次にチトクロームオキシダーゼ組織化学のために処理し、かつ隣接部分はそのニッスル小体を染色した。

結果

チトクロームオキシダーゼの存在は代謝活性の指標、即ち神経の生存性の指標と考えられる。ニッスル染色は細胞過程を可視化し、かつ神経損傷の一般的構造を評価するのに使用した。

中空カプセルを投与した実験群では、クロム親和性細胞を含有するビークルを移植した損傷を受けた動物と比較して、線条体が20-40%収縮した。中空カプセル投与群の線条体のニューロンはチトクロームオキシダーゼ染色がないことから、代謝活性に欠けていることを示した。更に、全ての動物は体重における有意の減少を示した(第10図)。

これとは対照的に、クロム親和性細胞含有ビークルを移植した群のニューロンはチトクロームオキシダーゼおよびニッスル両者による正常な染色を示し、体重変化を示さなかった。

結論

クロム親和性細胞含有インプラントを移植した対象のニューロンはキノリン酸により生ずる毒性促進性損傷から保護される。

実施例14: 神経変質の治療

本例では、フィンブリエー円重損傷のある動物の治療法を例示する。この種の損傷はニューロン細胞の死滅、シナプス後部ニューロンの劣化、および記憶並びに学習における欠陥を示す行動上の症状をもたらす。この動物モデルにおいて形成したコリン作性ニューロンの劣化はヒトにおけるアルツハイマー病に見られる効果と同様であると考えられる。

同時押し出し繊維を1:2の比率で1%CaCl₂と組織培養培地とを混合した溶液中に置めた。繊維を該溶液中で5分間維持して、該アルギン酸塩をゲル化させ、次いで培地を含むベトリ皿に移した。この繊維を、良好な管形状をもつ領域について肉眼で観察し、次にクロム親和性細胞の存在につきスポット-検査した。次いで、加熱、腐蝕の使用および加圧の組み合わせにより4mmの長さの部分の末端を封止することによりカプセルを形成した。次いで、該カプセルをスブラーグーダウレイラットの脳に定位的に移植した。

キノリン酸の調製

キノリン酸(シグマケミカル社(Sigma Chemical Co))を2N水酸化ナトリウム中に溶解し、pH7.2の塩酸バッファーで希釈して、最終pH 7.4および濃度225 nM/1 μlとした。

外科的手法

ラットをナトリウムペントバルビタール(45 mg/kg)で麻酔し、コップ(Kopf)定位装置に配置した。矢状結合の切開を頭皮部を実施し、該マクロカプセル化した副腎クロム親和性細胞を配置するために孔を頭蓋に形成した。カプセルを該定位デバイスに取り付けられた毛細管に入れ、以下の座標まで下げた: プレグマの前方0.3 mm、矢状結合の側方3.5 mmおよび脳の表面から腹側に7.5 mm。

1週間後、該動物を麻酔し、キノリン酸または塩酸バッファービークルを線条体内に投与する前に該定位装置内に配置した。形成した孔を介して、該カプセルを配置するサイトの側方0.8 mm位置に、溶液を徐々に注入(10 μl ハミルトン(Hamilton)注射器を使用して、0.125 μl/分)した。該キノリン酸の注入サイトはプレグマの前方0.3 mm、矢状結合の側方2.7 mmおよび脳の表面から腹側に5.5 mmであった。全体積1.0 μlを放出し、該注入カニューレを更に2分間その位置に残し、灌流液の局所的拡散を促進した。この手順は3つの実験群、即ち副腎カプセル/キノリン酸(N=8)、中空カプセル/キノリン酸(N=8)およびキノリン酸のみ(N=7)の形成をもたらした。

キノリン酸の投与後、15日に渡り毎日体重を記録した。

組織学

キノリン酸投与の30日後に、動物の心臓を経由するように、蠕動ポンプを使用

フィンブリエー円重損傷の外科的形成手順:

成熟雄スブラーグーダウレイラット(250-350g)をナトリウムペントバルビタール(55 mg/kg)の腹腔内注射により麻酔した。一個性のフィンブリエー円重損傷は該フィンブリエ、背面の円重、頸部の皮膚の内側部分、腹側の海馬の交差、脳梁および上部の荷状皮質の吸引により形成した。次いで、以下に記載の如きインプラントビークルを各動物の同一側の側方の脳室に配置させ、内部アウラ面(Internal plane)に直角に配向させた。

PAN/PVC 繊維の調製

選択透過性中空繊維を乾式ジェット-湿式紡糸法(カバッソ(Cabasso), 1980)に従って調製した。ジメチルスルホキシド(DMSO)中に溶解したPAN/PVCの15%溶液を環状紡糸口金を通して、溶媒DMSO(多孔性内部表面の形成のために)または非-溶媒としての水(滑らかなスキンをもつ内部表面を得るために)を該孔を通して流しつつ、押し出した。生成した繊維を非-溶媒としての水浴に養い、グリセリン処理し、次いで乾燥した。

遺伝子操作した繊維芽細胞

R20BN.8 およびR20BF ラットの繊維芽細胞はハーバード大学(Harvard Univ.)のDr. キサンドラブレイクフィールド(Xandra Breakerfield)から譲渡されたものであった。R20BN.8 繊維芽細胞を、以下のようにしてNGFを分泌するように操作した(ショート(Short)等, Dev. Neurosci., 1990, 12, pp. 34-45)。レトロウイルスベクターをモロニー(Moloney)二十鼠白血病ウイルスから複製した。このベクターは該ウイルスの5'長末端反復の調節下でマウスNGF cDNAのコード領域の最後の777塩基対を含んでいた。このベクターは、また内部ラウス肉腫プロモータの制御下でトランスポゾンTn5のネオマイシン-耐性遺伝子をコードする支配的選択性マーカーをも含んでいた。伝達性レトロウイルスを PA317 両性ウイルスプロドューサーマウス繊維芽細胞にベクターDNAをトランスフェクションすることにより、かつこれら細胞由来の媒質を使用して、T2エトロビック細胞を感染することにより生成した。高い力価を与える該T2クローン由来のウイルスで感染されたラット繊維芽細胞系R20BFを感染し、R20BN.8に形質転換するのに使用した。ネオマイシン類似体G418を含む培地中で選択した個々のネオマイシン-耐

性コロニーを阻害し、かつ2-サイトタイムノアッセイによりNGF産生および分泌につきテストした。

神経芽細胞のカプセル化

R208FおよびR208N.8の神経芽細胞をトリプシン-EDTAにより分解し、マトリゲル(Matrigel; 商標)またはビトロゲン(Vitrogen; 商標)に再懸濁したラミニン含有マトリゲル中に 1×10^4 細胞/ μ lなる密度で懸濁し、1ccシリンジで予め凝固したPAN/PVC中空繊維内に吸引した。繊維を長さ4cmの部分に切り、繊維の外科的焼灼器によって該繊維の末端を熱封止した。

ChAT免疫細胞化学

2週間後、該動物を殺し、ヘパリン化した生理塩水および8%パラホルムアルデヒド緩衝バッファー溶液を使用した経心臓灌流での灌流により固定した。該動物の脳を解剖し、解剖し、一夜後固定し、次いで15%および25%の緩衝化スクロース溶液に浸漬した。凍結した切片をクリオスタット上で前方から後方へ25 μ mに切断し、全冠状切片をスライド上にあるいは緩衝バッファー中に集めた。代表的な冠状切片を免疫細胞化学のために、ビオチン-アビジン-DAB法によりラットChATに対するモノクローナル抗体(2.5 μ g/ml)を使用して処理した。切片のスライドを作成し、神経細胞塊をクレジルバイオレットで対比染色した。内側側壁内および該領域の側面および対側側における垂直対角線領域(vertical diagonal band region)の、即ち脳梁と前部交差の交差との間の全ChAT-正の細胞塊を計数した。R208N.8カプセルを受容したラットにおいてChAT(+)細胞数の減少という有意の予防性が観察された。

実施例15: レシビエントへの高分子量生成物の放出のための免疫遮断性ビークルの利用

腫瘍壊死因子(TNF)に特異的な抗体(イソタイプ免疫グロブリンG)を産生するハイブリドーマ350,000個をプラズマフェリシス(プラズマファン(Plasmaphan); エンカ(Enka)社)で使用されている種の医学的等級のオレフィン製多孔性中空繊維(長さ7mm)内に手作業で装入して、免疫遮断性ビークルを調製した。該繊維の内径は300 μ mであり、そのMWCOは1,000 kDであった。該ビークルの末端を

utics, Inc.))はジメチルホルムキッドに溶解した(12.5% w/w)。このアクリル系コポリマー溶液を該紡糸口金の外チューブを通してポンプ輸送し、水をその内側チューブを通してポンプ輸送した。タイプ1中空繊維をエアージェットを介して水中に押し出し、乾式-湿式紡糸法で作成した繊維に典型的な孔のある外壁を形成した。同様に、但し該エアージェットを湿潤雰囲気により置き換えて、滑らかな外表面をもつ該タイプ2繊維を調製した。

ラット島細胞を、ウィスターファース(Wistar-Furth)ラットから上記実施例1に記載の如く単離した。この島細胞をアルギン酸ゲル内に固定し、レーシー(Lacey), P.E.等, サイエンス(Science), 1991, 254, p. 1782に記載の如く、2-cmのタイプ1またはタイプ2繊維に、繊維1本当たり500または1000島細胞なる密度でカプセル化した。

移植: このカプセル化したラット島細胞を、ストレプトゾチンの注射により糖尿病としたマウスの腹腔内または皮下に移植した。非-絶食条件下での血糖値グルコース濃度を1週間当たり3回測定した。該糖尿病レシビエントは、該移植前に400 mg/dl以上のグルコース濃度を有していた。移植密度は、1000島細胞/繊維の密度のカプセルについては、70島細胞/cmであり、また500島細胞/繊維の密度のカプセルについては35島細胞/cmであった。26匹のマウスの腹腔内に繊維を移植し、26匹のマウスの皮下に繊維を移植した。各群において、14匹のマウスには全体で1000島細胞を含む繊維を移植し、12匹のマウスには全体で500島細胞を含む繊維を移植した。

結果: 腹腔内に移植したタイプ1の繊維は、1000島細胞を含む繊維を移植したレシビエント9匹のうちの7匹および500島細胞を含む繊維を移植したレシビエント全体において、60日を超える期間に渡り正常血糖値を誘起しかつ維持した。500島細胞/繊維の密度のタイプ1インプラントを皮下に移植したレシビエントの何れも60日を超える期間に渡り正常血糖値を維持せず、1000島細胞を含む繊維を移植したレシビエント8匹のうちの3匹は60日を超える期間に渡り正常血糖値を維持した。これら3匹のレシビエントから該繊維を除去すると、該マウスは糖尿病状態に戻った。タイプ2繊維中のラット島細胞の移植は、500または1000島細胞/繊維なる密度のカプセル何れについても、腹腔内または皮下の何れの移植

組織中のU.S.S.N. 07/461,999号に記載の方法で封止した。このビークルを腎臓下に移植し、そこに14日間滞留させた。その後、該ビークルを回収したところ、指示染料(pI)による染色の回避により決定された如く、多くの細胞が含まれており、その50%を超える部分が生存していることを見出した。TNF-特異的抗体のレシビエントマウスの血清内への放出をELISA法により監視した。結果を以下にまとめた。

表2

移植後の日数	インビトロでのTNF-特異的抗体の力価
0	検出されず
1	10
2	30
6	70
8	100
11	60
15	23

インビトロで維持したコントロール免疫遮断性ビークルは同様な抗体放出性を示した。

実施例16: カプセル化島細胞の皮下移植

島細胞含有カプセルの調製: タイプ1およびタイプ2と呼ぶ2種のアクリル系コポリマーの中空繊維を使用した。該繊維はカー-オスマー-エンサイクロペディアオブケミカルテクノロジー(Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology), ウィリー, ニューヨーク, 第3版, 1980, Vol. 12, pp. 492-517のI-カバッソ(Cabasso), ホローファイバーメンブランズ(Hollow Fiber Membranes)に記載されたような紡糸口金を使用した乾式-湿式紡糸法に従って形成した。使用したアクリルコポリマー(サイズ排除クロマトグラフィーにより測定した分子量 $M_w = 300,000$, $M_n = 100,000$ を有する: サイトセラプティックス社(CytoThera-

サイトに対して、80%を超えるレシビエントマウス中に正常血糖値を生成し、かつ維持した。該レシビエントは、60日後に該繊維を除去すると、再度高血糖症となった。該回収したタイプ1およびタイプ2繊維の組織学的な検査は、これら繊維が生体適合性であることを明らかにした。

実施例17: ラット島細胞の創制された再複製

実施例11に記載のように、ラット島細胞を単離し、分離し、再複製し、かつカプセル化した。但し、封止した繊維をインビトロで血清に暴露せず、移植前に僅かに1時間維持した。2個の2cm長さのカプセルまたは2個の2cmおよび1cm長さのカプセルの何れかを各ラットに移植した。

島細胞を分離し、適当なサイズ、即ち35 μ mまで再複製させた。約500島細胞を含む該再複製させた細胞全てを、各々4〜6cm長さのカプセルに詰めた。移植したカプセルはラット中に60日を超える期間に渡り正常血糖値を維持できる。

実施例18: 平坦シート型島細胞カプセル化ビークルの製造

以下の全手順において無菌材料および方法を使用した。これはオートクレーブ滅菌、EtOH衛生化、UV滅菌および/または0.2 μ m滅菌濾過法を包含する。

注型溶液は、水溶性有機溶媒に溶解した、平均分子量 10^5 ダルトンをもつモノアクリルコポリマーを使用して調製した。この注型溶液は該有機溶媒中に10.0% w/wのポリマーを含んでいた。該ポリマーはその使用前に一旦無菌条件下で沈殿させて、あらゆる残留モノマー、オリゴマーまたは製造業者等によりポリマー本体中に添加されたあらゆる添加剤を除去した。このポリマー溶液を、次に乾燥し、100% DMSO中に再溶解して、10% w/wポリマー溶液を形成した。この溶液を0.2 μ m疎水性ナイロンフィルタに通し、無菌条件下で回収した。

次に、該注型溶液を1/4インチのガラス基板上に注型厚125 μ mで注型バーを用いて均一に展開した。フィルムを注型するために、30°傾斜させて保持した該基板を静止した該注型バーの下を移動させ沈殿槽に送った。該沈殿槽の底は該注型バーから1/8-1/4インチの範囲内にある。(該基板は、完全に沈殿する前に該膜の早期の剥がれを防止できる任意の材料で構成できる)。該展開と同時に、

該注型溶液を20℃の水中に投じて該ポリマーを沈殿させ、かつ異方性の平薄膜を形成した。その選択透過性は該膜の（該基質から離れた）冷却された側に薄いスキンとして現れた。これを取り出す前に十分な膜特性を達成するように、このフィルムを4分間該浴中に維持した。

次いで、このフィルムを一連の洗浄処理に付して、該最終生成物の生体適合性を低下する可能性のある有害な残留物またはあらゆる残留溶媒を除去した。これらの洗浄浴は、該元の膜に顕著な物理的または化学的変性を及ぼさない溶液を含むものであった。該第一の後処理浴はミリ-Q(Milli-Q) 精製系を通過させた水からなり、該フィルムを最低15分間浸漬状態に維持した。この物質を次いで取り出し、0.2 μ m の膜で濾過した底密に70%v/vのエチルアルコールの水溶液に、最低60分間入れ、次いで取り出した。最終段階では、2 ml/cm² 濃縮なる体積の2倍の一連の規定濃度の無菌塩水に該フィルムを、各々に対してそれぞれ最低60分間浸漬した。

結果： この最終的なウェット-アズ-キャスト(wet-as-cast) 膜の厚みは30~75 μ m の範囲内にあり、また5.0 psigにおける水圧透過率は0.475cc/分/cm²であった。已選係数のデータは、該膜が約100,000 ダルトンよりも大きな物質を排斥することを示した。

カプセル化および移植： 塩水中に浸漬した、無菌性の注型した10% 平坦シート膜を上記の如く調製し、カプセル化した鳥細胞を以下のように調製した。即ち、6×8インチの膜断片をそのスキン側が対向するように折り畳み、約1インチ幅の二重膜のストリップを形成した。この折り畳んだ膜を注意深く加圧して折り目を形成した。#10 メスを使用して、該1インチ幅の二重膜のストリップを該シートの残りの部分から切り取った。該二重ストリップをその一端から持ち上げて、狭く1インチ幅の切片を切断した。この角切片を切り出した後塩水中に入れた。各角片の先端および底部を一方の側を含む折り目により結合した。

添加の直前に、角片を持ち上げ、予め1~2 mlの1%CaCl₂ 溶液で浸漬させた3インチ径のポリスチレンベトリ皿の縁に置いた。この皿を広げ、各側部を該CaCl₂ 溶液が該膜の先端部に流入しないように注意しつつ、該溶液上に浮かせた。

この操作の前に、鳥細胞をペレットとし、1%のゲル化してないアルギン酸ナトリウム溶液（この溶液は2%のアルギン酸溶液を調製し、これを50/50 の割合で鳥細胞を培養した培地と混合することにより調製した）中に再懸濁させた。鳥細胞/アルギン酸溶液スラリーを攪拌し、かつ吸引して穏やかに混合した。該スラリーは単一の膜断片上の利用可能な表面積1 cm² 当たり、25 μ l のアルギン酸溶液中500 個の鳥細胞なる割合となるように調製した。これは1インチ角の膜シートに対して約125 μ l および2500ラット鳥細胞に等しい。

該鳥細胞/アルギン酸溶液スラリーを200 μ l ビベット先端中に吸引し、次いで均一に、該角シートの全端部に沿って約1/8 インチのギャップを残すように、1枚の膜の内側に展開した。この展開は迅速に実施された。というのは、アルギン酸が下層にあるCaCl₂ 溶液から該膜を通して拡散するCa⁺⁺により速に架橋されるからである。

アルギン酸の汚染を防止しつつ、一旦該アルギン酸を十分に架橋（約1~2分）したら、該平坦シートデバイスの地方の側を折り畳んで、平坦シートのサンドイッチ構造を形成した。気泡が混入しないように注意した。

適度の温度（80~160℃）の1/8 インチの加熱要素を備えたインパルスヒートシーラーを使用して、該膜の2つの側部を封止した。折り畳まれた部分を含む各端部を、該ヒートシーラーを動作させて、各端部に沿ってアルギン酸で被覆されていない膜の1/8 インチストリップ上で加圧しつつ、別々に封止した。

封止後、該デバイスを4分間1%CaCl₂ 溶液に浸漬して、該アルギン酸を更に架橋させた。このデバイスを移植するまでハンクス溶液中に維持した（2時間以内）。

平坦シートを、化学的に糖尿病にしたレシビエントウイスターファースラットの腹腔内に移植した。この移植は皮膚を介して正中線を切開し、麻酔した該ラットの腹腔内に行った。この平坦シートインプラントは、平滑な鋸子で該封止した端部を把持し、該腹腔内に近接する盲腸(gut pile)の頂部に自由に浮遊するように該デバイスを穏やかに設置することにより該腹腔内に配置した。該腹腔および皮膚を縫合により閉じた。

動物を21日間に渡り研究し、この時点で該デバイスを外植した。血中グルコース濃度は、移植後4日以内に375mg/dlから150mg/dlまで低下し、かつこの濃度で

取り出すまで維持され、この取り出し時点においてグルコース濃度は275mg/dl(n=2)まで増大した。

組織学的検査は、該膜の外側に付着した細胞の単分子層未満で該アルギン酸膜層中に固定化された生存鳥細胞の存在を明らかにした。

等価物

当業者は、日常的な実験を実施する程度で、本明細書に記載した本発明の特定の態様に等価な多くの態様があることを認識または理解できよう。これらの並びに全ての他のかかる態様は以下の請求の範囲に包含されるものである。

FIGURE 1

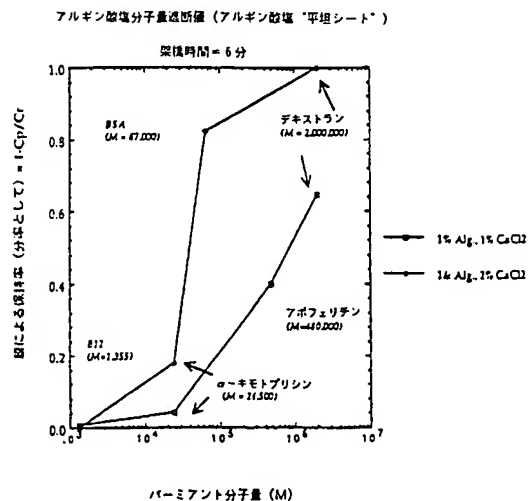


FIGURE 2A

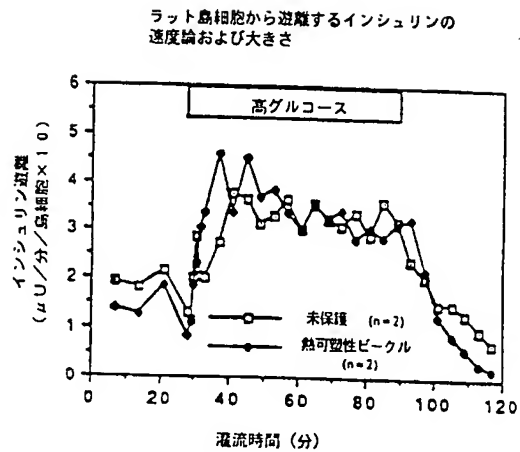


FIGURE 2B

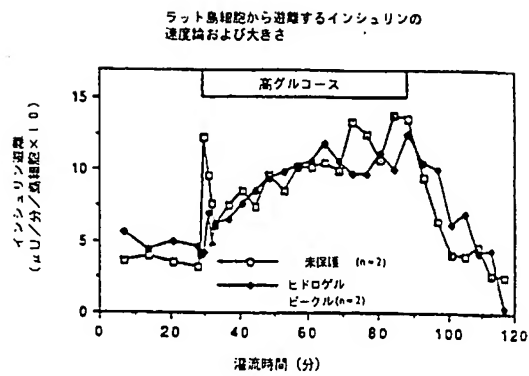


FIGURE 3A

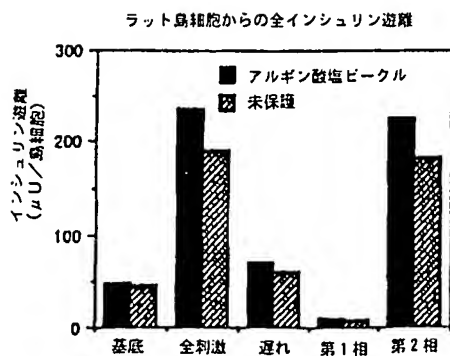


FIGURE 3B

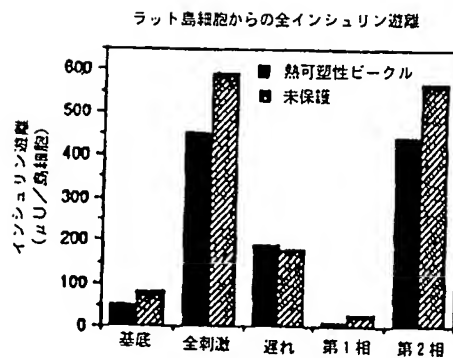


FIGURE 6

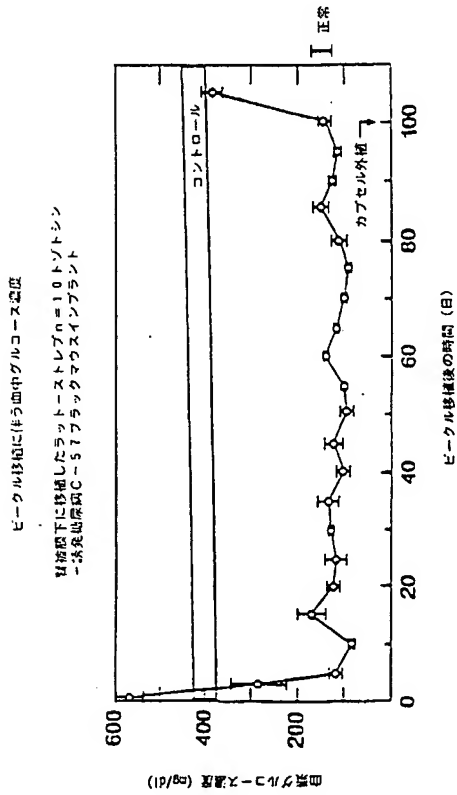
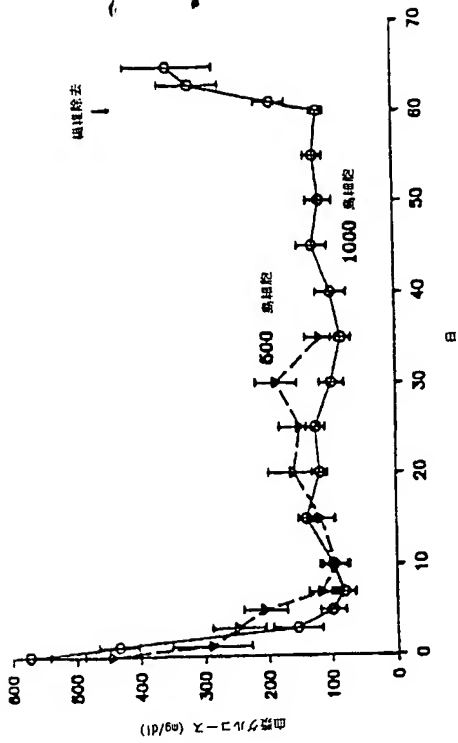


FIGURE 4

マウス中のラット血球 N = 7



ヒドロゲル固持 (分率として) = 1-Cp/Cr

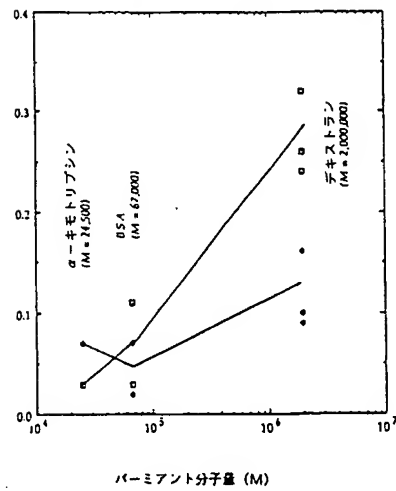


FIGURE 7

2%アルギン酸/2% CaCl₂/2分 (1.5時間および1.8時間)

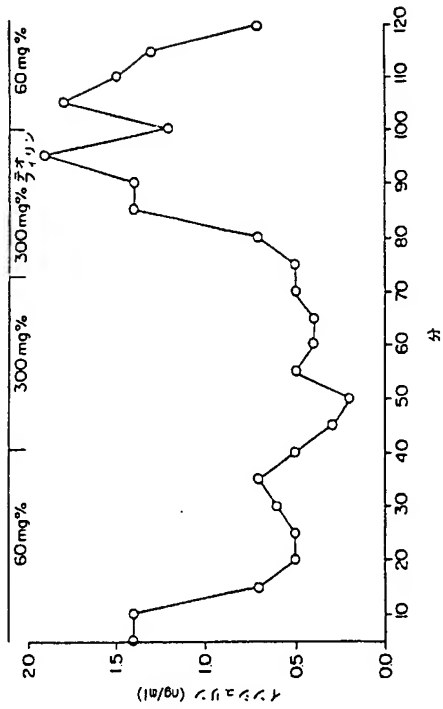


FIG5

移植後35日目のグルコース濃度 (mg%)

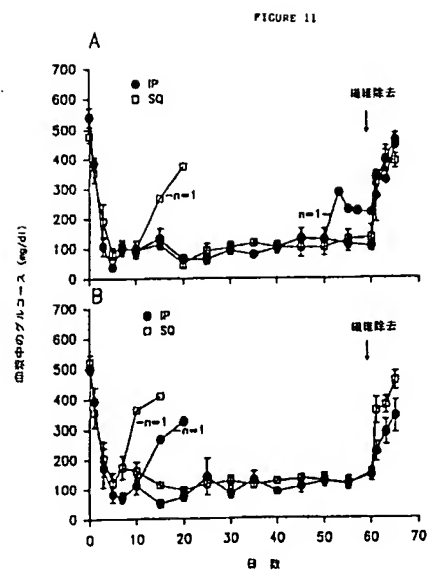
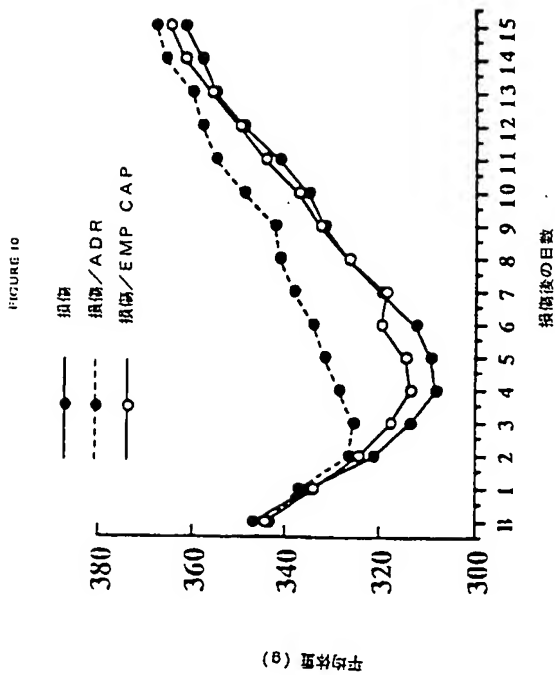
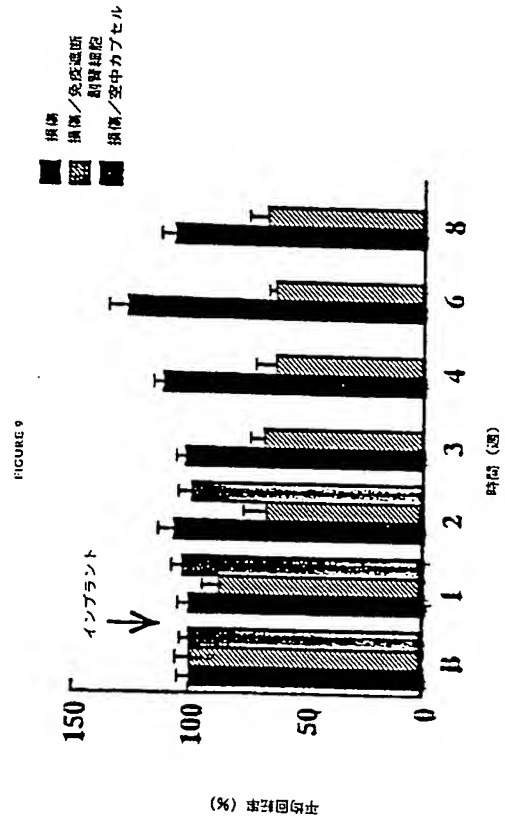
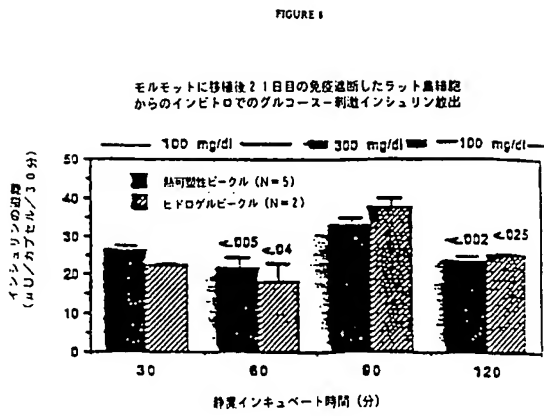
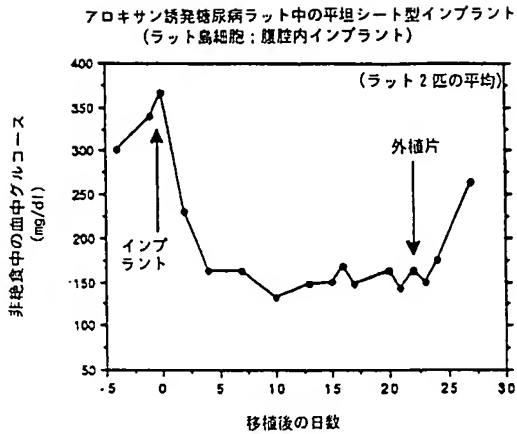


FIGURE 12



国際調査報告

International application No.
PCT/JP92/03377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(1) : A61P 13/00 US CL : 424/423 (According to International Patent Classification (IPC) or to both national classifications and IPC)		
B. FIELDS SEARCHED		
Maximum dissemination method (transmission system followed by classification system)		
U.S. : 424/423; 424/423		
Documents searched other than maximum dissemination to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data has been searched during the international search (name of data base used, where practicable, search terms used) API		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Classes of documents, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Reference to class No.
Y	USA 4,943,129 (DOOLEY ET AL) 17 JULY 1990 COLUMNS 3-5, 17,18	1-43,48-43
Y	USA 4,943,248 (TRANG ET AL) 05 MAY 1997 COLUMN 1, LINES 10-15; COLUMN 3, LINES 3-11; COLUMN 4, LINES 25-35	1-43,48-43
Y	USA 4,233,388 (SEPTON) 13 OCTOBER 1997 COLUMN 7, LINES 4-27	1-43,48-43
A	USA 4,806,353 (DOOLEY ET AL) 21 FEBRUARY 1999 COLUMN 2, LINES 40-40	1-43,48-43
A	USA 4,291,309 (LDM) 05 JULY 1993 COLUMN 2, LINES 38-52	1-43,48-43
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family names.		
* Symbol indicates the nature of the document: "A" Document defining the present state of the art which is not considered to be part of prior art. "Y" Document published on or after the international filing date. "L" Document which may have been or is being considered in which is not a material part of the present state of the art. "F" Document referred to in or from documents, not published or other. "P" Document published prior to the international filing date but later than the present date of the art. "S" Document published after the international filing date but prior to the present date of the art.		
Date of the actual completion of the international search 13 JULY 1992		Date of mailing of the international search report 08 OCT 1992
Name and mailing address of the ISA/ Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531		Authorized officer SALLIE GARDNER Telephone No. (703) 308-7311
Form PCT/ISA/210 (Issued under 11 July 1992)		

国際調査報告

International application No.
PCT/JP92/03377

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
The international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2A) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: (44 AND 47)	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
The international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remarks on Prior Art <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	
Form PCT/ISA/210 (Continuation of first sheet) (15 July 1992)	

フロントページの続き

(72)発明者 エメリック ドゥウェイン エフ
アメリカ合衆国 ロードアイランド州
02908 プロヴィデンス イレヴンス ス
トリート 13

(72)発明者 ホッフマン ダイアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州
02143 サマーヴィル ベルモント スト
リート 33 アpartment 2

(72)発明者 シャープ ディヴィッド ダブリュー
アメリカ合衆国 ミズーリー州 63146
セント ルイス ダンストン ドライブ
1129

(72)発明者 レイシー ポール
アメリカ合衆国 ミズーリー州 63119
ウェブスター グローヴス マーシャル
ブレイス 63

(72)発明者 エイビッシャー バトリック
アメリカ合衆国 ロードアイランド州
02806 パーリントン チェシャー ドラ
イヴ 7

(72)発明者 サンバーグ ポール アール
アメリカ合衆国 フロリダ州 34610 ス
プリング ヒル パイロット カントリー
ドライブ 11751

(72)発明者 クリステンソン リサ
アメリカ合衆国 ロードアイランド州
02860 ポータキット プログレス スト
リート 120

(72)発明者 ヘーグル オリオン ディー
アメリカ合衆国 ロードアイランド州
02814 チバチェット ホワイトハウス
ドライブ 28

(72)発明者 ヴァスコンセロス アルフレッド ヴィー
アメリカ合衆国 ロードアイランド州
02918 クランストン ラティン ナイト
ロード 766

(72)発明者 ライサート マイケル ジェイ
アメリカ合衆国 ロードアイランド州
02818 イースト グリニッチ リヴァー
ラン 16

(72)発明者 ジェンタイル フランク ティー
アメリカ合衆国 ロードアイランド州
02888 ウォーウィック ローン アベニ
ュー 57